

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

AUSWIRKUNG EINER  
SPLANCHNIKUSSPEZIFISCHEN SYMPATHEKTOMIE AUF DIE  
TRANSLOKATION UND SYSTEMISCHE STREUUNG VON  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS  
BEI EXPERIMENTELLER LEBERZIRRHOSE

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Katja Segerer

unter Anleitung von  
Prof. Dr. med. R. Wiest

2012



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

AUSWIRKUNG EINER  
SPLANCHNIKUSSPEZIFISCHEN SYMPATHEKTOMIE AUF DIE  
TRANSLOKATION UND SYSTEMISCHE STREUUNG VON  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS  
BEI EXPERIMENTELLER LEBERZIRRHOSE

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Katja Segerer

unter Anleitung von  
Prof. Dr. med. R. Wiest

2012

**Dekan:**

**Prof. Dr. Dr. T. Reichert**

**1. Berichterstatter:**

**Prof. Dr. Reiner Wiest**

**2. Berichterstatter:**

**Privatdozent Dr. Wulf Schneider**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**26.2.2013 Bern, 5.3.2013 Regensburg**

# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>6</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1 Bakterielle Infektionen im Rahmen der Grunderkrankung Leberzirrhose.....	7
1.2 Pathophysiologie der Infektionsanfälligkeit bei Leberzirrhose und Therapieansätze .....	8
1.3 Sympathikushyperaktivität bei fortgeschrittener Leberzirrhose .....	12
1.4 Interaktionen zwischen Noradrenalin und Immunsystem.....	13
<b>2. HYPOTHESE.....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>16</b>
3.1 Material .....	16
3.2 Versuchstiere, Tierhaltung und tierexperimentelles Arbeiten .....	17
3.3 Methoden .....	18
3.3.1 Leberzirrhosemodell der Ratte.....	18
3.3.2 Splanchnikusspezifische Sympathektomie .....	19
3.3.3 Herstellung der Lösung mit <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
3.3.4 Bakterielle Peritonitis mit <i>Staphylococcus aureus</i> - Versuchsablauf .....	22
3.3.5 Aszitesanalyse .....	23
3.3.6 Mikrobiologische Untersuchungen .....	23
3.3.7 Statistische Analyse .....	24
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>25</b>
4.1 Allgemeine Bemerkungen und Übersicht Versuchszahlen.....	25
4.2 Ergebnisse Körpergewicht, Organgewichte, Aszitesvolumen .....	25
4.3 Ergebnisse Bakteriämie.....	27
4.4 Ergebnisse bakterieller Streuung und Belastung in mesenteriale Lymphknoten.....	28
4.5 Ergebnisse bakterieller Streuung und Belastung in Milz, Leber und Lunge .....	30
4.6 Ergebnisse der Leukozytenzahlen im Aszites von Zirrhoseratten .....	32
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>34</b>
Einleitung .....	34
Ausgangsparameter der Versuchsgruppen .....	34
Infektionsabwehr in der Zirrhosegruppe .....	35
Auswirkung der splanchnikusspezifischen Sympathektomie auf die systemische Streuung von <i>Staphylococcus aureus</i> und gramnegativen Erregern .....	35
Immunabwehr von gramnegativen und grampositiven Bakterien.....	36
Schlussfolgerung.....	37
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>38</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>41</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>49</b>
Erklärung gemäß § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung.....	49
Veröffentlichung .....	49
Danksagung.....	50

## ABKÜRZUNGEN

CFU	colony forming units
GNB	gramnegative Bakterien
MLK	mesenteriale Lymphknoten
SBP	spontan bakterielle Peritonitis
anti-D $\beta$ H-SAP-Immunotoxin	anti Dopamin $\beta$ -Hydroxylase Saporin-Immunotoxin
Zirr	Zirrhosegruppe ( <i>Versuchsgruppe</i> )
Zirr-SE	Zirrhosegruppe mit Sympathektomie ( <i>Versuchsgruppe</i> )
Kon	Kontrollgruppe ( <i>Versuchsgruppe</i> )
Kon-SE	Kontrollgruppe mit Sympathektomie ( <i>Versuchsgruppe</i> )

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Bakterielle Infektionen im Rahmen der Grunderkrankung Leberzirrhose

Bakterielle Infektionen stellen für Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose eine häufige und oft lebensbedrohliche Komplikation ihrer Erkrankung dar.<sup>1,2</sup> Für Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose, die stationär aufgenommen werden, zeigen aktuelle Studien eine Prävalenz bakterieller Infektionen von 32-34%, wobei die Ätiologie der Leberzirrhose eine untergeordnete Rolle spielt.<sup>3,4</sup> Ein fortgeschrittenes Stadium der Leberzirrhose geht dabei mit einem höheren Risiko für bakterielle Infektionen einher.<sup>3</sup> Die Mortalität von Leberzirrhosepatienten im Rahmen einer bakteriellen Infektion liegt bei 15% und ist damit mehr als doppelt so hoch wie die Mortalität von Leberzirrhosepatienten ohne Infektion.<sup>3</sup> Bedeutend ist darüber hinaus, dass Infektionen in 30-50% der Fälle direkt ursächlich für das Versterben von Patienten mit Leberzirrhose sind.<sup>5</sup>

Als häufigste bakterielle Infektionen treten bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose die spontan bakterielle Peritonitis, Harnwegsinfektionen, Pneumonien und eine spontane Bakteriämie auf.<sup>3, 4, 6</sup> Die spontan bakterielle Peritonitis ist eine Infektion, die fast ausschließlich bei Leberzirrhose auftritt, während eine bakterielle Infektion von Aszites im Rahmen eines malignen Geschehens bzw. eines nephrotischen Syndroms eine Rarität darstellt.<sup>7-9</sup> Auch nimmt die spontan bakterielle Peritonitis durch ihre Definition eine Sonderstellung ein, da sie als bakterielle Infektion eines vorbestehenden Aszites definiert wird, ohne dass im Gegensatz zur sekundären bakteriellen Peritonitis eine abdominelle Hohlorganperforation nachgewiesen werden kann.

Überwiegend sind gramnegative Darmbakterien Auslöser von Infektionen im Rahmen der Grunderkrankung Leberzirrhose, jedoch werden zunehmend auch grampositive Kokken als Infektionserreger nachgewiesen.<sup>4</sup> So konnte gezeigt werden, dass bereits 2002 für Infektionen bei Leberzirrhosepatienten in bis zu 53% der Fälle grampositive Kokken verantwortlich sind.<sup>4</sup> Bei nosokomialen Infektionen bei Patienten mit Leberzirrhose finden sich in ca. 60% grampositive Kokken als Erreger.<sup>4</sup> Grampositive Erreger lassen sich besonders bei Leberzirrhosepatienten nachweisen, die auf der Intensivstation behandelt werden bzw. bei Patienten, bei denen invasive Eingriffe durchgeführt wurden.<sup>4</sup> Es wird angenommen, dass invasive Therapien wie endoskopische Ligaturbehandlung und interventionelle radiologische Eingriffe für die angestiegene Häufigkeit grampositiver Infektionen eine Rolle spielen.<sup>4</sup>

## 1.2 Pathophysiologie der Infektionsanfälligkeit bei Leberzirrhose und Therapieansätze

Die Ursache für die im Rahmen der Leberzirrhose beobachtete Infektionsanfälligkeit scheint multifaktoriell bedingt zu sein und verschiedenste pathogenetisch bedeutende Veränderungen sind bei Leberzirrhosepatienten beschrieben.

Das Auftreten einer bakteriellen Translokation wird speziell in der Pathogenese der spontan bakteriellen Peritonitis als wesentlicher Schritt angesehen.<sup>10-13</sup> Definiert ist die bakterielle Translokation als Streuung von Bakterien oder bakteriellen Produkten aus dem Darmlumen in mesenteriale Lymphknoten oder extraintestinale Organe ohne Vorliegen einer Verletzung des Darms.<sup>14</sup> Jedoch wird zunehmend deutlicher, dass zwischen bakterieller Translokation als physiologischem Phänomen<sup>15, 16</sup> und pathologischer bakterieller Translokation differenziert werden muss.<sup>15</sup> Dabei wird davon ausgegangen, dass ein Nachweis von Darmbakterien in mesenterialen Lymphknoten unter physiologischen Bedingungen möglich ist<sup>15, 16</sup> und erst, wenn darauf eine lokale oder systemische Entzündungsantwort ausgelöst wird, eine pathologische bakterielle Translokation vorliegt.<sup>15</sup> So wird vermutet, dass in der Pathogenese der bakteriellen Translokation bei Leberzirrhose zusätzlich zu Faktoren wie intestinaler bakterieller Überwucherung<sup>17-19</sup>, intestinaler Hypomotilität<sup>20-22</sup> und einer gesteigerten Permeabilität der intestinalen Mukosa<sup>23-25</sup> auch Veränderungen der angeborenen und erworbenen Abwehr eine entscheidende Rolle spielen könnten.<sup>15</sup> Erst dadurch, so wird vermutet, resultiert aus dem physiologischen Phänomen der bakteriellen Translokation eine pathologische bakterielle Translokation.<sup>15</sup> In diesem Zusammenhang bleibt bisher unklar, ob die Abwehrmechanismen im Rahmen einer gesteigerten intestinalen Permeabilität auf Ebene der intestinalen Mukosa nicht greifen, woraus dann eine Infektion der mesenterialen Lymphknoten resultiert oder ob erst innerhalb der mesenterialen Lymphknoten eine pathologische bakterielle Translokation stattfindet, wenn auf dieser Ebene Abwehrmechanismen nicht physiologisch funktionieren und somit eine Ausbreitung von Bakterien über den Ductus thoracicus bis in die systemische Zirkulation möglich ist.<sup>11</sup>

Die Hypothese des Phänomens einer pathologisch gesteigerten bakteriellen Translokation wird unterstützt durch die Beobachtung, dass im Tierexperiment mit immunsupprimierten Mäusen für translozierte Bakterien eine systemische Ausbreitung möglich ist und dies zur Sepsis führen kann.<sup>26</sup> Ebenfalls wurde an Mäusen gezeigt, dass die chirurgische Entfernung von mesenterialen Lymphknoten mit einer Invasion der Erreger in die Milz assoziiert ist und eine systemische Entzündungsantwort ausgelöst wird.<sup>27</sup> Diese Daten unterstreichen die



möglicherweise wichtige Rolle eines intakten Immunsystems um das Phänomen der bakteriellen Translokation in physiologischen Grenzen zu halten.

Therapeutisch wurde versucht das Wissen über die Zusammenhänge zwischen bakterieller Translokation und spontan bakteriellen Infektionen zu nutzen um die Morbidität und Mortalität von Leberzirrhosepatienten durch bakterielle Infektionen zu reduzieren. So konnte gezeigt werden, dass eine selektive intestinale Dekontamination durch Gabe von Fluorchinolonen als Primärprophylaxe bakterieller Infektionen bei Leberzirrhosepatienten wirksam ist.<sup>28, 29</sup> Jedoch wurden Studien zur Primärprophylaxe mit Gyrasehemmern kritisiert und bedeutender, auch Antibiotika-resistente Bakterienstämme zwingen dazu, andere Methoden zur Infektionsprophylaxe im klinischen Kontext einzusetzen.<sup>4, 30, 31</sup> So konnte gezeigt werden, dass auch eine Beeinflussung der intestinalen Hypomotilität durch das prokinetisch wirkende Cisaprid bei Zirrhoseratten die bakterielle Translokation reduziert<sup>32</sup> und beim Menschen eine Kombinationstherapie mit Norfloxacin und Cisaprid die Inzidenz der spontan bakteriellen Peritonitis senkt.<sup>33</sup>

Im Experiment mit Zirrhoseratten konnte außerdem gezeigt werden, dass auch der  $\beta$ -Blocker Propranolol die intestinale Motilität steigert und eine bakterielle Translokation signifikant reduziert.<sup>34</sup> Der nichtselektive  $\beta$ -Blocker Propranolol wird bei Leberzirrhose allgemein verwendet um die portale Hypertension zu behandeln, wobei nicht alle Patienten mit einem hämodynamischen Ansprechen reagieren.<sup>35</sup> Interessanterweise konnte in einer Meta-Analyse von 2009 gezeigt werden, dass Propranolol bei Patienten mit Leberzirrhose – unabhängig von hämodynamischen Verbesserungen – zur Prophylaxe einer spontan bakteriellen Peritonitis bei Leberzirrhosepatienten mit Aszites wirksam ist.<sup>36</sup> Dadurch stellt sich *in puncto* Infektionsprophylaxe bei Leberzirrhosepatienten möglicherweise eine neue Therapieoption dar, ohne dass bisher geklärt werden konnte auf welcher Ebene – intestinale Motilität und bakterielle Translokation oder angeborene und erworbene Immunität - Propranolol in die Immunabwehr bei Leberzirrhose eingreift.

Im Folgenden sollen daher Veränderungen der angeborenen und erworbenen Immunität bei Leberzirrhose dargestellt werden, da für Leberzirrhose postuliert wurde, dass aus dem physiologischen Phänomen der bakteriellen Translokation erst ein pathologisches Phänomen wird, weil Abwehrmechanismen nicht angemessen funktionieren.<sup>15</sup> Insgesamt ist die Pathophysiologie auf dieser Ebene weit weniger verstanden als das Phänomen der bakteriellen

Translokation, sodass hier mögliche therapeutische Maßnahmen längst nicht vergleichbar untersucht sind wie Maßnahmen zur Beeinflussung der bakteriellen Translokation.

Allgemein erfolgen Erkennung von Pathogenen und Aktivierung der Immunabwehr zunächst über das angeborene, unspezifische Immunsystem. Hierbei werden unveränderliche Merkmale der Pathogene, die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), unter anderem über Toll-like Rezeptoren (TLRs) auf Zellen der angeborenen Immunität erkannt.<sup>37</sup> Die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, die je nach Pathogen und Immunzelle sehr unterschiedliche Adaptermoleküle beinhaltet, endet unter anderem in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, einem zentralen Transkriptionsfaktor der angeborenen Immunität.<sup>37</sup> Letztlich resultiert die Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden. Mittlerweile sind beim Menschen insgesamt 10 Rezeptoren bekannt, die zur Familie der Toll-like Rezeptoren gerechnet werden und in unterschiedlichem Maße durch PAMPs gramnegativer und grampositiver Bakterien sowie von Viren aktiviert werden.<sup>37</sup> Bereits auf dieser ersten Ebene der Immunabwehr sind mit der Beschreibung einer Überexpression von TLR 2 und einer Downregulation von TLR 4 auf den Blutmakrophagen bei Leberzirrhosepatienten Veränderungen nachgewiesen.<sup>38, 39</sup> Bisher bleibt die funktionelle Bedeutung dieser Beschreibung unklar, jedoch wird vermutet, dass diese Veränderungen zur LPS-Toleranz bei Leberzirrhose beitragen könnten.<sup>38, 39</sup> Andererseits lassen erhöhte Spiegel des Zytokins *tumor necrosis factor* (TNF) bei Leberzirrhosepatienten annehmen, dass ein erster Schritt der Aktivierung der angeborenen Immunabwehr durchaus erfolgt.<sup>40</sup>

Ein weiterer entscheidender Schritt der angeborenen Immunität ist die Phagozytose von Pathogenen durch Phagozyten wie neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, die einerseits zellulär über Toll-like Rezeptoren und Ausschüttung von Mediatoren vermittelt ist, andererseits durch humorale Komponenten des Komplementsystems ausgelöst wird.<sup>41</sup> Dass ein gestörter Phagozytoseprozess zu vermehrten Infektionen führen kann, wurde für unterschiedliche Erkrankungen gezeigt.<sup>42, 43</sup>

Untersuchungen zur Phagozytoseleistung bei Leberzirrhose zeigen, dass sowohl bei Patienten<sup>44-49</sup> als auch in Tiermodellen mit fortgeschrittener Zirrhose<sup>50, 51</sup> eine verminderte Leistung der polymorphonukleären Neutrophilen (PMN) nachzuweisen ist. Dies konnte für PMN des Blutes<sup>44-47, 49, 51</sup> als auch für gewebsständige PMN gezeigt werden<sup>48, 50, 51</sup>. Jedoch werden diese Ergebnisse kontrovers diskutiert. So beschreiben Kirsch et al. beispielsweise

eine reguläre Phagozytoseaktivität bei Patienten mit stabiler, unkomplizierter Leberzirrhose, sodass gefolgert werden könnte, dass Patienten mit unkomplizierter Leberzirrhose von Patienten mit fortgeschrittener Zirrhose zu unterscheiden sind.<sup>52</sup>

Entscheidend für eine funktionierende Immunität ist auch das Komplementsystem, bei dem mehr als 20 Serumproteine kaskadenartig aktiviert werden und letztlich der Membranangriffskomplex (*membrane attack complex, MAC*) gebildet wird, der durch Porenbildung zum Zelltod der Pathogene führt beziehungsweise der infizierten Zellen im Organismus.<sup>53</sup> Ebenfalls bedeutend ist, dass das Komplementsystem an der Vermittlung der Chemotaxis von Entzündungszellen und der Phagozytose durch Monozyten und Neutrophile beteiligt ist.<sup>54</sup> Weiterhin wird zunehmend klarer, dass das Komplementsystem auch für die Regulation der erworbenen Immunität bedeutend ist.<sup>55</sup>

Mehrheitlich werden Komplementfaktoren von der Leber synthetisiert.<sup>56</sup> Es konnte nachgewiesen werden, dass bei Leberzirrhosepatienten die Komplementkonzentration verringert ist, insbesondere die des Faktors C3<sup>57, 58</sup>, was allgemein mit rekurrenden schweren Infektionen durch grampositive und gramnegative Erreger assoziiert ist.<sup>59</sup> So wurde gezeigt, dass eine erniedrigte C3-Konzentration des Serums Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose für Infektionen prädisponiert<sup>60</sup> und dass eine erniedrigte C3-Konzentration im Aszites häufiger mit einer spontan bakteriellen Peritonitis einhergeht.<sup>61</sup>

Die Physiologie der erworbenen Immunität erscheint noch weitaus komplexer als die der angeborenen Immunität und die gegenseitige Beeinflussung der beiden Seiten ist bis heute ein Gebiet intensiver Forschung. Entscheidend ist, dass im Rahmen der erworbenen Immunität spezifisch Pathogene eliminiert werden wofür unter anderem Antikörper wichtige Effektoren sind. Zum anderen vermittelt die erworbene Immunität ein immunologisches Gedächtnis. Auf zellulärer Ebene wird die erworbene Immunität durch antigenpräsentierende Zellen (*antigen-presenting cells, APCs*), T- und B-Lymphozyten vermittelt.

Für Leberzirrhosepatienten zeigen *in vivo* Experimente eine gestörte T-Zell Funktion, was klinisch mit dem häufig fehlenden Ansprechen auf eine Impfung bei Leberzirrhose in Zusammenhang gebracht wird.<sup>62</sup> In Tiermodellen mit athymischen Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass im homozygoten Knockout-Tier eine spontane bakterielle Translokation erfolgt und wichtiger, dass hier eine Ausbreitung von translozierten *E. coli* in Milz und Leber erfolgt.<sup>63</sup> Auch wenn diese Daten eine pathogenetische Verbindung zwischen T-Zellen und

pathologisch gesteigerter bakterieller Translokation vermuten lassen, liegen konkret für Leberzirrhose keine Untersuchungen vor.

Auf Ebene der B-Zellen konnte gezeigt werden, dass Leberzirrhosepatienten eine verringerte fäkale IgA-Sekretion aufweisen<sup>64</sup> und dass im experimentellen Modell mit IgA-defizienten Mäusen eine gesteigerte bakterielle Translokation stattfindet.<sup>65</sup> Auch wenn die Produktion von sekretorischem IgA durch B-Lymphozyten der Mukosa insgesamt als wichtiger Abwehrmechanismus unseres Organismus an der großen Oberfläche des Darms gegenüber den Milliarden von Darmbakterien angesehen wird, deren Eindringen in unseren Organismus tödlich wäre, ist die Bedeutung der beschriebenen reduzierten fäkalen IgA-Sekretion bei Leberzirrhosepatienten in Bezug auf deren Infektionsanfälligkeit nicht weiter untersucht.

Abschließend sei erwähnt, dass im Rahmen einer Lebertransplantation immer wieder deutlich wird, dass die Leber selbst als „Immunorgan“ betrachtet werden muss, wobei sie wahrscheinlich wesentlich eine immunologische Toleranz gegenüber Antigenen aus der Nahrung vermittelt.<sup>66</sup> Andererseits trägt die Leber entscheidend zur Elimination von Pathogenen bei, die über das portalvenöse Blut direkt in die Leber gelangen und wirkt hier als immunologisches Filterorgan.<sup>66</sup> Diese Aufgabe vermitteln vor allem die Kupfferzellen.<sup>66</sup> Unklar ist jedoch, in wie weit diese immunologischen Funktionen im Rahmen einer Leberzirrhose beeinflusst werden und ob ein Zusammenhang mit bakterieller Translokation und der beobachteten Infektionsanfälligkeit bei Leberzirrhosepatienten besteht.

### 1.3 Sympathikushyperaktivität bei fortgeschrittener Leberzirrhose

In Zusammenhang mit der beobachteten und nur teilweise verstandenen erhöhten Infektionsanfälligkeit bei Leberzirrhose ist zu erwähnen, dass im Rahmen der fortgeschrittenen Leberzirrhose ein Phänomen auftritt, das als Sympathikushyperaktivität bezeichnet wird.<sup>67, 68</sup> Hierbei ist die Konzentration von Noradrenalin exzessiv erhöht, einerseits systemisch, andererseits vermutlich besonders massiv im Splanchnikusgebiet.<sup>69, 70</sup> Ursächlich hängt das Phänomen der Sympathikushyperaktivität mit einer insgesamt gestörten Hämodynamik bei Leberzirrhose zusammen, bei der eine übermäßige Vasodilatation mit dem Ziel einer verbesserten Perfusion der zirrhotischen Leber über Vasokonstriktoren gegenreguliert wird.<sup>71</sup>

Bekanntermaßen werden dem sympathischen Transmitter Noradrenalin immunmodulierende Effekte zugeschrieben,<sup>72-76</sup> deren Grundzüge im folgenden Abschnitt dargestellt werden.

In Zusammenhang mit erstens dem Phänomen der Sympathikushyperaktivität bei fortgeschrittener Leberzirrhose, zweitens mit der unbeantworteten Frage wann und warum einzelne Schritte der Immunabwehr bei Leberzirrhose nicht richtig funktionieren und drittens mit den Ergebnissen aus der Metaanalyse zur SBP-Prophylaxe mit Propranolol<sup>36</sup> sind die Interaktionen zwischen Sympathikus und Immunsystem besonders interessant und könnten eine Erklärung der Metaanalyseergebnisse darstellen.

#### 1.4 Interaktionen zwischen Noradrenalin und Immunsystem

Bekanntermaßen vermittelt der sympathische Transmitter Noradrenalin unter klinischen Bedingungen wie einer Infektion als auch experimentell *in vitro* und *in vivo* immunmodulierende Effekte.<sup>72-76</sup> Hierbei ist zunächst wichtig, dass anatomische und physiologische Grundlagen für eine solche Interaktion zwischen Sympathikus und Immunsystem vorhanden sind.

In anatomischen Studien konnte gezeigt werden, dass primäre und sekundäre lymphatische Gewebe sympathisch innerviert sind und zwar sowohl efferent als auch afferent im Falle von Lymphknoten und Knochenmark<sup>73, 74, 77</sup>. Weiterhin wird in lymphatischen Geweben der klassische sympathische Transmitter Noradrenalin ausgeschüttet.<sup>74</sup>

Eine weitere, notwendige Grundlage für die Interaktion zwischen Sympathikus und Immunsystem ist das Vorhandensein entsprechender Rezeptoren auf Immunzellen. Untersuchungen zeigen, dass Neutrophile, Basophile, Eosinophile, Makrophagen sowie NK-Zellen vor allem den  $\beta$ 2-Adrenozeptor exprimieren.<sup>78</sup> Auch eine Expression des  $\alpha$ 1-Adrenozeptors ist auf Makrophagen beschrieben.<sup>79</sup> Auf B-Lymphozyten sowie CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, finden sich ebenfalls Adrenozeptoren, wobei es sich hier um den  $\beta$ 2-Adrenozeptor handelt.<sup>80</sup> Eine Ausnahme machen TH2-Zellen, auf denen keine  $\beta$ 2-Adrenozeptoren gefunden werden.<sup>80</sup>

Eine weitere bedeutende Grundlage der Interaktion zwischen Immunsystem und Nervensystem ist die Beobachtung, dass auch Immunzellen Noradrenalin synthetisieren und somit von einer bidirektionalen Interaktion der beiden Systeme auszugehen ist.<sup>81</sup>

Während die Voraussetzungen für eine bidirektionale Interaktion zwischen Sympathikus und Immunsystem relativ eindeutig nachzuweisen sind, ist es deutlich schwieriger die funktionelle Beeinflussung der Immunzellen während der Infektionsabwehr durch Noradrenalin zu beschreiben. Zunächst wurde allein eine immunsuppressive Beeinflussung der Immunabwehr durch Noradrenalin angenommen, jedoch wird diese Vermutung heute in Frage gestellt durch

Ergebnisse zur Stimulation von Phagozytose und Chemotaxis. So wurde das Konzept insofern erweitert, dass auch Parameter wie absolute Noradrenalkonzentration, Dauer der Konzentrationseinwirkung sowie das Alter des Organismus von Bedeutung sind.<sup>80, 81</sup> Studien, die speziell einzelne Schritte der Immunabwehr, meist *in vitro*, untersuchen, haben zur Aufklärung der Interaktion zwischen Noradrenalin und Immunsystem selbstverständlich ihre Berechtigung, jedoch lassen diese Experimente nur schwer auf die letztlich resultierende Richtung einer Immunregulation durch Noradrenalin im Organismus schließen. Erschwerend weichen Ergebnisse zum Einfluss von Noradrenalin über Adrenozeptoren auf Immunzellen in Tierexperimenten und Experimenten mit menschlichen Immunzellen voneinander ab.<sup>79</sup>

Somit ist bis heute nicht abschließend geklärt, unter welchen Bedingungen dem sympathischen Transmitter Noradrenalin proinflammatorische oder immunsuppressive Effekte zuzuschreiben sind. Die Bedeutung der vorhandenen Studienergebnisse in Bezug auf die Sympathikushyperaktivität in der Pathogenese der Infektionsanfälligkeit bei Leberzirrhose soll daher im *in vivo* Experiment evaluiert werden.

## **2. HYPOTHESE**

Auf Grundlage der aktuellen Studienergebnisse, die in der Einleitung dargestellt sind, lässt sich folgende Hypothese formulieren:

Unter der Annahme, dass das Phänomen der Sympathikushyperaktivität einen Baustein in der Pathogenese der Infektionsanfälligkeit bei Leberzirrhose darstellt, verringert eine splanchnikusspezifische Sympathektomie die Ausbreitung einer peritonealen Infektion mit *Staphylococcus aureus* bzw. mit gramnegativen Bakterien im Rattenmodell mit experimenteller Leberzirrhose.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### Substanzen

Tetrachlorkohlenstoff	Carbon Tetrachloride for IR-Spectro-SCO, Sigma Aldrich Chemie GmbH
Phenobarbital	Luminal®, Desitin Arzneimittel GmbH Hamburg
70%iger Alkohol	B. Braun Melsungen AG
Braunol®	Braunol® Providon-Iod, B. Braun Melsungen AG
anti Dopamin $\beta$ -Hydroxylase-SAP-Immunotoxin	Chemicon International, Inc.
0,9% NaCl-Lsg.	B. Braun Melsungen
Staphylococcus aureus ATCC 6538	Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg
LB-Medium	haus eigene Herstellung
PBS-Pufferlösung	Phosphat Buffer Saline, haus eigene Herstellung
sterilisiertes Millipore-Wasser (entionisiertes Wasser)	haus eigene Herstellung

##### Materialien und Geräte

sterile Einmalspritzen (1ml, 5ml, 10ml)	Becton Dickinson S.A.
sterile Einmalkanülen	Becton Dickinson S.A.
Sterile Pipetten (10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l)	Eppendorf Research
Agarplatten mit Frischblut-, Mueller-Hinton- und McConkey Nährböden	Institut für Mikrobiologie, Universität Regensburg
Blutkulturflaschen	Bactec 40ml für 1-3ml, Becton Dickinson
pyrogenfreie safe-lock Reaktionsgefäße 1,5 ml	Safe-lock Tubes 1,5ml Eppendorf Biopur, Eppendorf AG
sterile safe-lock Reaktionsgefäße 1,5 ml	Safe-lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG
steriles Abdecktuch	Foliodrape 45cm x 75cm, Hartmann
sterile Operationshandschuhe	Semperit Technische Produkte G.m.b.H.
Handschuhe	Peha-soft, Hartmann AG
Operationsbesteck	Aesculap AG
sterile Kompressen	10cm x 10cm, 12-fach, Hartmann AG
Alufolie	handelsüblich
steriles Blutentnahmeset	Safety-Multifly-Set für S-Monovette, Sarstedt
Blutentnahmeröhrchen 1,2 ml	S-Monovette 1,2ml, K3E, Sarstedt
Blutentnahmeröhrchen 5,5ml	S-Monovette 5,5ml, LH, Sarstedt
Adapter für Blutentnahmeröhrchen	Membrane-Adapter, Sarstedt
sterile Impfschlingen 10 $\mu$ l	Sarstedt
Schüttler	Ceromat R, B. Braun Biotech International
Kühlzentrifuge	Megafuge 1.0 R, Kendro Laboratory Products



Bohrmaschine	Bosch PSB 500 RE
sterile Glasröhrchen	Firma VWR International
Vortex Mixer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Eismaschine UBE 125	Ziegra Eismaschinen
Tischautoklav	Wolf, Geislingen
Photometer	Analytik Jena AG
Anlage zur Herstellung von entionisiertem Wasser	Merck Milipore
Laborwaage, SC2020	Ohaus, Giessen
Homogenisator (Glas-Glas) nach Tenbroeck	Merck, Darmstadt

### 3.2 Versuchstiere, Tierhaltung und tierexperimentelles Arbeiten

Kontrollratten	7
Zirrhoseratten	8
Kontrollratten mit Sympathektomie	9
Zirrhoseratten mit Sympathektomie	10
<b>Gesamtzahl Versuchstiere</b>	<b>34</b>

Alle Tierversuche wurden an männlichen CD-Ratten (CD-Sigma, Charles River Laboratories, Niederlassung Sulzfeld) mit einem Ausgangsgewicht von 50-55g durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte bei freiem Zugang zu Nahrung und Wasser und konstanten Temperaturverhältnissen von 21°C in einem zwölf Stunden Tag-Nacht-Rhythmus in Plexiglaskäfigen. Alle Tierversuche erfolgten im Rahmen eines Genehmigungsantrags (54-2531.1-10/06, Regierung der Oberpfalz). Auf die strenge Einhaltung der Richtlinien zum tierexperimentellen Arbeiten nach dem Tierschutzgesetz (TierSchG) wurde stets geachtet.

Um während der Tierversuche eine balancierte, intramuskulär applizierbare Narkose zu ermöglichen, wurde folgende Narkosemischung aus 0,3ml Medetomidin (Domitor®), 0,4ml Midazolam (Dormicum®), 0,2ml Fentanyl (Fentanyl 0,1mg DeltaSelect) und 0,1ml 0,9% NaCl-Lsg. für alle Versuchstiere verwendet. (Dosierung bei Kontrolltieren: 0,1ml/100g KG. Dosierung bei Zirrhosetieren: 0,05ml/100g KG (wegen reduzierter hepatischer Metabolisierung)).

Zur Antagonisierung der atemdepressiv wirkenden Substanzen der Narkose wurde nach erfolgter intraperitonealer Injektion von *S. aureus* intramuskulär ein Atemdepression-Antidot aus 0,15ml Atipamezol (Antisedan®), 4,0ml Flumazenil (Anexate®), 0,15ml Buprenorphin (Temgesic®) und 0,7ml 0,9% NaCl-Lsg. an alle Versuchstiere verabreicht. (Dosierung bei Kontrolltieren: 0,2ml/100g KG, Dosierung bei Zirrhosetieren: 0,1ml/100g KG (wegen

reduzierter hepatischer Metabolisierung)).

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Leberzirrhosemodell der Ratte

Zur Induktion der Leberzirrhose wurde unter dem Luftabzug des Tierlabors eine Inhalationsbehandlung der Ratten mit einem Druckluft-Tetrachlorkohlenstoff-Gemisch durchgeführt. Dazu wurden die Tiere in einen speziellen Plexiglaskäfig mit der Möglichkeit zur Einleitung eines Druckluft-Dampf-Gemischs gesetzt. Für die Inhalationsbehandlung wurde über ein Schlauchsystem zunächst Druckluft (Fluss 3L/min) in eine spezielle, verschlossene Flasche mit flüssigem Tetrachlorkohlenstoff eingeleitet und so mit dem leicht verdampfbaren  $\text{CCl}_4$  angereichert. Das Druckluft- $\text{CCl}_4$ -Gemisch wurde dann über ein weiteres Schlauchsystem in den nur hierfür verwendeten speziellen Plexiglaskäfig eingeleitet. Sobald die Ratten auf das  $\text{CCl}_4$ -Gasgemisch komatös reagierten, wurde die Applikation von  $\text{CCl}_4$  umgehend beendet und die Tiere wurden in ihre normalen Plexiglaskäfige zurückgesetzt, wo sie sich stets innerhalb weniger Minuten von der narkotisierenden  $\text{CCl}_4$ -Gasgemischwirkung erholten. Während der ersten vier Wochen erfolgte die Inhalationsbehandlung der Tiere dreimal wöchentlich, folgend fünfmal pro Woche. Nach durchschnittlich zwölf Wochen entwickelten die Ratten klinisch erkennbaren Aszites und erreichten somit das Stadium einer dekompenzierten Leberzirrhose. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Inhalationsbehandlung der Ratten mit Aszites für weitere vier bis maximal fünf Wochen durchgeführt. Zur Induktion der Leberzirrhose wurde außerdem das Trinkwasser der Tiere bereits drei Tage vor Beginn der Inhalationsbehandlung mit 0,35g/L Phenobarbital angereichert und folgend für die gesamte Versuchsdauer beibehalten.

Für Ratten sind experimentelle Modelle mit inhalativem Tetrachlorkohlenstoff zur Ausbildung einer chronischen Leberschädigung, Ausbildung einer Leberzirrhose sowie Ausbildung von präneoplastischen Läsionen im Rahmen der Hepatocarcinogenese seit langem bekannt und vielfach eingesetzt worden.<sup>82, 83, 84</sup> Für das in dieser Arbeit angewandte Tiermodell der Leberzirrhose liegen histologische Voruntersuchungen von Lebern von CD-Ratten der Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Wiest vor. Sie zeigen nach zwölfwöchiger  $\text{CCl}_4$ -Inhalationsbehandlung bei gleichzeitiger Anreicherung des Trinkwassers mit Phenobarbital das histologische Bild einer mikronodulären zirrhotischen Leber.

Die Hepatotoxizität des  $\text{CCl}_4$ -Dampfes ist ein multifaktorieller Prozess. In den Hepatozyten wird Tetrachlorkohlenstoff vom Cytochrom P450 zum  $\text{CCl}_3$ -Radikal metabolisiert. Das  $\text{CCl}_3$ -Radikal führt durch Bindung an verschiedene zelluläre Moleküle zur Ausbildung einer Steatosis hepatis. Das  $\text{CCl}_3$ -Radikal reagiert außerdem mit Sauerstoff zum Trichlormethylperoxid ( $\text{CCl}_3\text{OO}$ )-Radikal.  $\text{CCl}_3\text{OO}$ -induzierte Kettenreaktionen führen durch Veränderungen der Permeabilität verschiedener Zellmembranen zur Zerstörung der Kalzium-Homöostase der Hepatozyten, was zu hepatozellulärem Zelltod und hepatischer Fibrose führt.<sup>85</sup>

Außer einer Hämatotoxizität und Nephrotoxizität, welche erst bei extremst hohen inhalativen Dosen von  $\text{CCl}_4$  auftreten, konnten bei Ratten durch eine  $\text{CCl}_4$ -Inhalationsbehandlung keine Organschädigungen nachgewiesen werden, insbesondere keine toxischen Effekte auf die gastrointestinale Mukosa und das Peritoneum.<sup>85</sup>

Phenobarbital führt zur Induktion des Cytochrom P450-Systems und erhöht nachgewiesenermaßen die hepatotoxische Wirkung des Tetrachlorkohlenstoffs.<sup>86, 87</sup> Es wird daher in vielen  $\text{CCl}_4$ -Zirrhose-Tiermodellen zusätzlich verabreicht.

### 3.3.2 Splanchnikusspezifische Sympathektomie

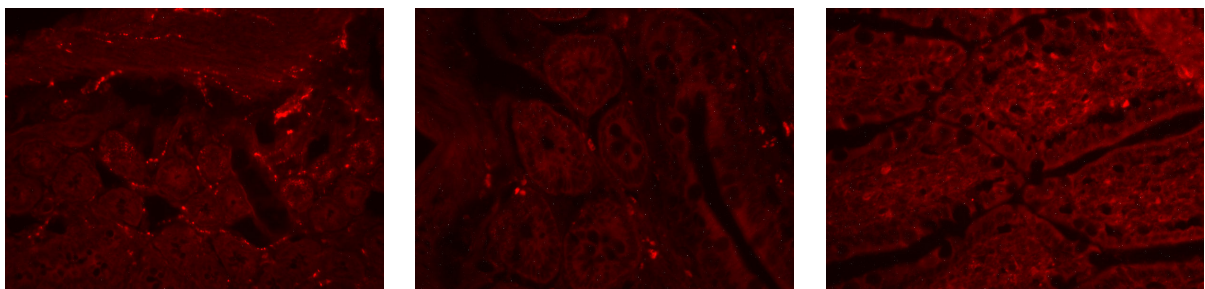
Sobald die Ratten im Rahmen der Inhalationsbehandlung das Bild einer dekompenzierten Leberzirrhose mit klinisch erkennbarem Aszites entwickelten, wurden in Narkose mit einer 22G Kanüle unter sterilen Bedingungen 5µl anti-Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase-Saporin-Immunotoxin in 3ml 0,9% NaCl-Lsg. intraperitoneal injiziert. Nach der intraperitonealen Applikation des anti-DBH-SAP-Immunotoxins wurde Atemdepression-Antidot verabreicht. Die Kontrollgruppen wurden ebenfalls narkotisiert und lediglich 3ml 0,9% NaCl-Lsg. injiziert.

Das anti-DBH-SAP-Immunotoxin besteht aus einem monoklonalen Antikörper gegen das Enzym Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase.<sup>88</sup> Zusätzlich ist der Antikörper über eine Disulfidbrücke mit dem Ribosom-Inaktivierungsprotein Saporin konjugiert.<sup>88</sup> Das Enzym Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase kommt in Vesikeln von noradrenergen Nervenendigungen der postganglionären sympathischen Neurone vor und katalysiert dort die Synthese von Noradrenalin aus Dopamin.<sup>88</sup> Das anti-DBH-SAP-Immunotoxin bindet an die membranständige Form der Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase, die bei Freisetzung von Noradrenalin aus Vesikeln in die präsynaptische Membran der noradrenergen Nervenendigungen eingebaut wird.<sup>89</sup> Beim

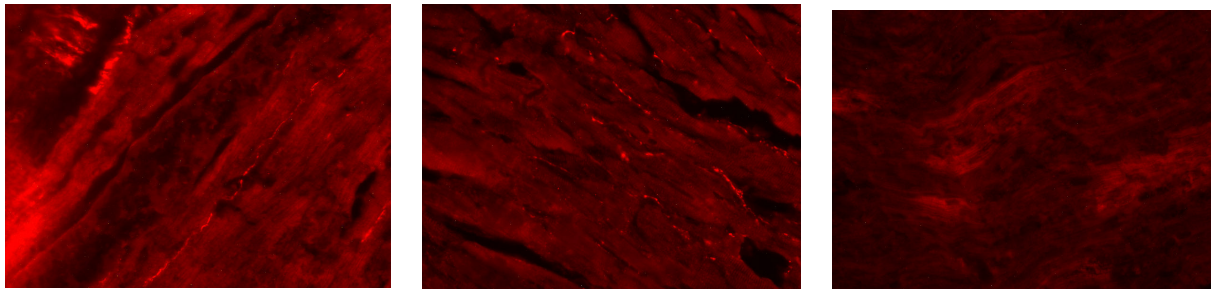
Endozytosevorgang werden Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase und das daran gebundene anti-D $\beta$ H-SAP-Immunotoxin aufgenommen und es erfolgt ein retrograder axonaler Transport.<sup>89</sup> Durch Reduktion der Disulfidbrücke des anti-D $\beta$ H-SAP-Immunotoxins wird das Saporin ins Zytoplasma freigesetzt.<sup>89</sup> Saporin führt als Ribosom-Inaktivierungsprotein zur Hemmung der Proteinsynthese und zusätzlich über Apoptose zum Zelltod.<sup>90, 91</sup>

Die in dieser vorliegenden Arbeit angewandte Methode der splanchnikusspezifischen Sympathektomie, bei der die Sympathikusfunktion anderer Körperregionen unbeeinflusst bleibt, wurde von Wiest et al. im Rahmen eines DFG-Projekts etabliert und ist bisher nicht veröffentlicht. Immunhistochemische Untersuchungen, die in diesem Rahmen an Ratten mit Aszites durchgeführt wurden, zeigen, dass nach intraperitonealer Applikation von 5 $\mu$ l anti-D $\beta$ H-SAP-Immunotoxin die postganglionären noradrenergen sympathischen Neurone im Splanchnikusgebiet (inklusive der Peritonealwand) nach einem Zeitraum von drei Wochen zerstört sind. Dabei wurden stellvertretend für Gewebe der Splanchnikusregion Milz und Jejunum immunhistochemisch untersucht, sowie stellvertretend für extraintestinale Organe Herzmuskelgewebe. Anhand eines Scoring-Systems wurde die sympathische Organinnervation evaluiert. Zur Dokumentation der Methode werden im Folgenden Abbildungen der originalen immunhistochemischen Darstellungen der Methode abgebildet.

**Immunhistochemische Darstellung der sympathischen Nervenfasern** (rote Anfärbung) im Dünndarm und im Herzmuskel von Ratten 4 Wochen nach intraperitonealer Applikation von Placebo (3ml 0,9% NaCl-Lösung), 4 Wochen nach intraperitonealer Applikation von 5 $\mu$ l anti-Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase-SAP-Immunotoxin und zum Zeitpunkt nach 4 Wochen ohne Behandlung (Negativ-Kontrollen).



**Immunhistochemische Darstellung der sympathischen Innervation (rot) von Dünndarm mit Zotten.** Von links nach rechts: nach intraperitonealer Injektion von Placebo (NaCl), nach intraperitonealer Injektion von anti-Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase-SAP-Immunotoxin, bei unbehandelten Ratten (Negativ-Kontrolle) jeweils zum Zeitpunkt nach 4 Wochen.



**Immunhistochemische Darstellung der sympathischen Innervation (rot) von Herzmuskulatur.** Von links nach rechts: nach intraperitonealer Injektion von Placebo (NaCl), nach intraperitonealer Injektion von anti-Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase-SAP-Immunotoxin, bei unbehandelten Ratten (Negativ-Kontrollen) jeweils zum Zeitpunkt nach 4 Wochen.

Weitere Untersuchungen zeigen, dass die erzielte spezifisch splanchnische Sympathektomie nach zwei Wochen beginnt reversibel zu werden, sodass in dieser vorliegenden Arbeit alle Tierexperimente im Zeitraum von vier bis maximal fünf Wochen nach Sympathektomie durchgeführt wurden.

Mit Hilfe dieser splanchnikusspezifischen Methode lässt sich gezielt die Rolle der exzessiv splanchnischen sympathischen Hyperaktivität bei Leberzirrhose<sup>67-71</sup> untersuchen ohne gleichzeitige Veränderung des systemischen Sympathikotonus. Dies ist von entscheidender Bedeutung, weil die sympathische Innervation bei einer schweren Infektion wie der spontan bakteriellen Peritonitis für die Regulation der Hämodynamik (Herzfrequenzanstieg, Blutdruckregulation, Anpassung der Nierenfunktion) eine wichtige Rolle spielt und wichtiger noch, um die Untersuchungsergebnisse zur Erläuterung der Bedeutung der spezifisch splanchnischen sympathischen Hyperaktivität als pathogenetischen Mechanismus für die Infektionsanfälligkeit bei Leberzirrhose allein hierauf zurückzuführen.

### 3.3.3 Herstellung der Lösung mit *Staphylococcus aureus*

Für alle Experimente wurden ausgehend von einer Kolonie *S. aureus* ATCC 6538, einem Stamm ohne *Toxic Shock Syndrom Toxin-1* (TSST-1), Aliquots mit gleichbleibenden Eigenschaften hergestellt. Dafür wurde *S. aureus* in 20ml LB-Medium über 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C auf dem Schüttler bei 200 Drehungen/min angezüchtet. Von der erhaltenen Bakterienlösung wurde ein Volumen von je 100µl in 100 Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend bei -15°C tiefgefroren. Zur Reinheitskontrolle der hergestellten Aliquots wurde zum einen aus der angezüchteten Bakterienlösung, als auch aus einem der tiefgefrorenen Aliquots eine Kontrollkultur durchgeführt. Dabei zeigte sich nach 48h keine Verunreinigung durch andere Bakterien.

Vor Beginn eines jeden Tierexperiments wurde aus einem *S. aureus* Aliquot eine

Bakterienlösung mit optimal lebensfähigen Keimen in einer Konzentration von  $10^6$  CFU/ml hergestellt. Dazu wurde ein Aliquot in 5ml LB-Medium erneut 24 Stunden im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  auf dem Schüttler kultiviert. Zur Aufreinigung der gezüchteten *S. aureus* Kulturen vom Nährmedium wurde die angezüchtete Bakterienlösung 10min bei  $4^\circ\text{C}$  und 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, durch 5ml 1xPBS ersetzt und mit dem Vortex Mixer durchmischt. Es erfolgten nach gleichem Schema eine zweite Aufreinigung ebenfalls mit 1xPBS sowie eine dritte und vierte Aufreinigung mit jeweils 5ml steriler NaCl-Lsg.

Mit Hilfe eines Photometers wurde bei 620nm die Transmission der aufgereinigten Keimlösung bestimmt. Anhand einer vorher durchgeführten Verdünnungsreihe zur Abschätzung der CFU/ml ausgehend von photometrisch gemessenen Absorptionswerten, die ein Verhältnis entsprechend einer Transmission von 1 zu  $10^6$  CFU/ml ergeben hatten, wurde eine Keimlösung von  $10^6$  CFU *S. aureus* in 3ml 0,9% NaCl-Lsg. hergestellt. Diese Keimlösung wurde für den folgenden tierexperimentellen Versuchsteil hergestellt. Um eine Verunreinigung auszuschließen wurde von der hergestellten Keimlösung eine Reinheitskontrolle angezüchtet. Dabei zeigte sich in allen Versuchen keine bakterielle Verunreinigung.

### 3.3.4 Bakterielle Peritonitis mit *Staphylococcus aureus* - Versuchsablauf

Die Keimlösung von 3ml mit  $10^6$  CFU *S. aureus* ATCC 6538 wurde unmittelbar nach Herstellung unter sterilen Bedingungen intraperitoneal appliziert. Hierdurch wurde eine experimentelle *S. aureus* Peritonitis induziert. Das Tier wurde dafür bereits während der Aufreinigungsphase der *S. aureus* Lösung narkotisiert. Vor Applikation der Keimlösung wurde das rasierte Abdomen der Ratte mit Braunol® desinfiziert. Nach der intraperitonealen Applikation wurde dem Tier Atemdepression-Antidot verabreicht.

Sechs Stunden nach intraperitonealer Applikation der *S. aureus* Lösung wurde unter streng sterilem Arbeiten durch eine Laparotomie Aszites gewonnen, Blut aus der abdominalen Aorta entnommen sowie Lymphknoten, Leber, Milz und Lunge exstirpiert. Hierfür erfolgte erneut eine Narkose des Tiers. Das narkotisierte Tier wurde anschließend auf einer steril abgedeckten Arbeitsfläche mit Klebestreifen fixiert und das bereits rasierte Abdomen wurde mit Braunol® desinfiziert. In einem ersten Schritt wurde die abdominale Faszie freigelegt. Es wurde erneut mit Braunol® desinfiziert. Danach erfolgte mit einer 22G Kanüle die Punktion des Aszites und Eröffnung der Bauchhöhle. Das Intestinum wurde auf sterile Kompressen zur Seite

geschlagen. Mit einer Spritze wurde Aszites aus der Peritonealhöhle aufgesaugt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die mesenterialen Lymphknoten im Bereich des terminalen Ileums und Coecums präpariert, entnommen und zunächst in ein steriles Alufolienschälchen gelegt. Danach erfolgte mittels eines Blutentnahmesets die Punktion der abdominellen Aorta zur arteriellen Blutentnahme von ungefähr 3ml Blut bis zur Butleere. Das befüllte Lithium-Heparin-Blutröhrchen wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt. Nun wurden Leber und Milz entnommen. Schließlich erfolgte die Eröffnung der Pleurahöhle. Beide Lungenflügel wurden exstripiert. Alle entnommenen Gewebe wurden jeweils in sterile Alufolienschälchen gelegt.

### 3.3.5 Aszitesanalyse

Aszites wurde unter sterilen Bedingungen in ein EDTA-Röhrchen überführt. Vom Institut für Klinische Chemie und Laborationsmedizin der Universitätsklinik Regensburg wurde eine Analyse der Zellzahl und Zelldifferenzierung (Erythrozyten / Leukozytenpopulationen / Bakterien) durchgeführt.

### 3.3.6 Mikrobiologische Untersuchungen

Aszites: Zum Nachweis der abdominellen Infektion wurde je ein Tropfen Aszites auf einer Agarplatte mit Frischblut, McConkey und Mueller-Hinton für 48 Stunden bei 37°C kultiviert.

Blut: Um eine Bakteriämie zu erfassen, wurden Blutkulturflaschen (aerob und anaerob) mit je 1,5ml arteriellem Blut beimpft.

Mesenteriale Lymphknoten, Leber, Milz und Lunge: Unter sterilen Bedingungen wurde das Gewicht der mesenterialen Lymphknoten, Leber, Milz und Lunge erfasst. Ein Anteil eines jeden Gewebes wurde jeweils getrennt in ein steriles Glasröhrchen überführt und eine dem Gewicht entsprechende Menge an sterilem Millipore Wasser hinzugegeben. Anschließend wurden die gewonnen Gewebeproben mit einem sterilen Mörser homogenisiert. Jeweils 100µl des Homogenisats wurden auf Agarplatten mit Frischblut-, McConkey- und Mueller-Hinton-Nährboden ausgestrichen und bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Nach 48 Stunden erfolgte das Auszählen der gewachsenen Kolonien.

Das Wachstum von *S. aureus* auf Blutagarplatten konnte durch die charakteristische goldene Farbe der *S. aureus* Kolonien nachgewiesen werden. Durch die Verwendung von McConkey Agar gelang eine Identifikation von gramnegativen Erregern, da auf McConkey nur ein selektives Wachstum von gramnegativen Bakterien möglich ist. Eine weitere Differenzierung

der gramnegativen Bakterien erfolgte nicht.

Für Blutkulturen wurde bei positivem Keimwachstum eine spezifische Identifizierung durch das Institut für Mikrobiologie der Universität Regensburg vorgenommen und die Ergebnisse wurden danach schriftlich übermittelt.

### 3.3.7 Statistische Analyse

Die Aufteilung der Tiere erfolgte in vier Gruppen: 1. Kontrollratten; 2. Kontrollratten mit Sympathektomie; 3. Zirrhoseratten; 4. Zirrhoseratten mit Sympathektomie.

In den vier Gruppen wurden folgende Parameter als deskriptive Statistik analysiert: Körpergewicht und Organgewichte, Aszitesvolumen, Zellzahl und Leukozytendifferenzierung im Aszites, Wachstum von *S.aureus* und gramnegativen Bakterien in Asziteskulturen, Wachstum von *S. aureus* und GNB in der Kultur des Homogenisats der mesenterialen Lymphknoten, Wachstum von *S. aureus* und GNB in arteriellen Blutkulturen, Wachstum von *S. aureus* und GNB in Kulturen des Milz-, Leber- und Lungenhomogenisats.

Die Ergebnisse sind als Median  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zur Überprüfung auf Varianzgleichheit bei unabhängigen Stichproben wurde der *Levene-Test* angewandt. Die Testung auf Mittelwertgleichheit bei unabhängigen Stichproben erfolgte anhand des *Student's t-test*. Dabei wurde ein zweiseitiges 5%iges Signifikanzniveau festgelegt ( $p \leq 0,05$ ).

Alle Analysen wurden mit SPSS (Version 13.0) durchgeführt.



## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Allgemeine Bemerkungen und Übersicht Versuchszahlen

Weder Zirrhoseratten noch Kontrollratten verstarben während der Beobachtungszeit von 6 Stunden nach intraperitonealer Applikation von *S. aureus*.

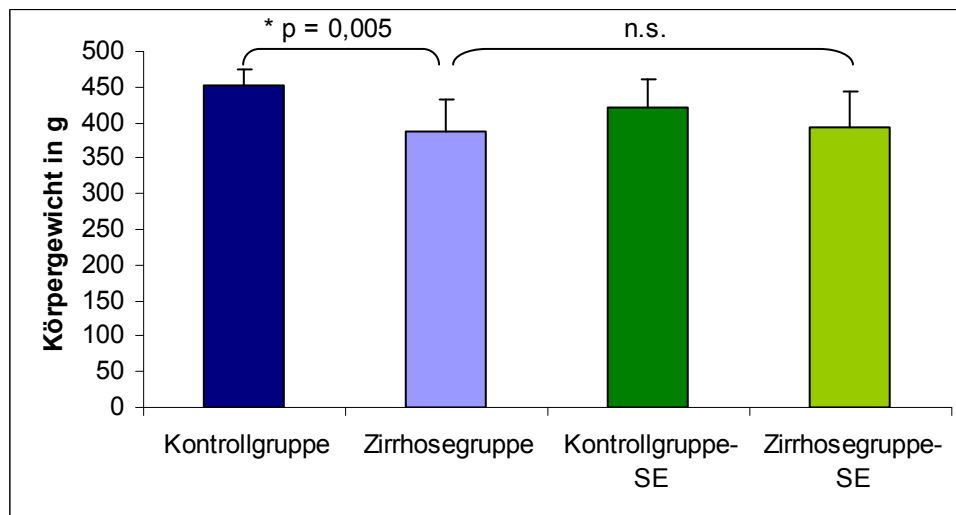
Jeder Nachweis eines bakteriellen Wachstums auf Agarplatten nach Kultur des jeweiligen Gewebehomogenisats bzw. in Blutkulturen wurde als Ausbreitung in dieses Organ bzw. in den Blutkreislauf bewertet.

Kontrollratten	n = 7
Zirrhoseratten	n = 8
Kontrollratten mit Sympathektomie	n = 9
Zirrhoseratten mit Sympathektomie	n = 10
<b>Gesamtzahl Versuchstiere</b>	<b>n = 34</b>

Tabelle 1: Übersicht Versuchszahlen

### 4.2 Ergebnisse Körpergewicht, Organgewichte, Aszitesvolumen

Bei der Analyse des Körpergewichts zum Versuchszeitpunkt zeigte sich, dass die Zirrhoseratten im Vergleich zu den Ratten der Kontrollgruppe signifikant leichter waren (\*p=0,005). Die Zirrhosegruppe zeigte gegenüber der Zirrhosegruppe mit Sympathektomie keinen signifikanten Gewichtsunterschied. (Graphik 1)



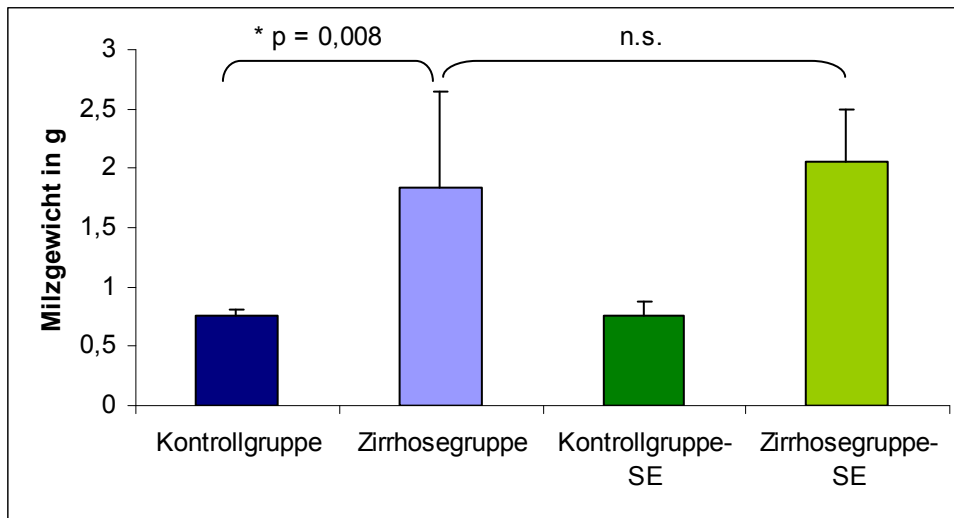
Graphik 1: Körpergewicht zum Versuchszeitpunkt:

Zirrhoseratten vs. Kontrollratten:  $388,13\text{g} \pm 43,26\text{g}$  vs.  $451,00\text{g} \pm 23,38\text{g}$ ; \*p=0,005.

Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie:  $388,13\text{g} \pm 43,26\text{g}$  vs.  $392,70\text{g} \pm 49,84\text{g}$ ; p=0,84.

Die deskriptive Statistik zeigt einen signifikanten Unterschied des Milzgewichtes der Zirrhosegruppe gegenüber der Kontrollgruppe (\*p=0,008). Jedoch zeigt der Vergleich des Milzgewichtes der Zirrhosegruppe gegenüber der Zirrhosegruppe mit Sympathektomie keine

signifikanten Unterschiede. (Graphik 2)



**Graphik 2: Milzgewicht:**

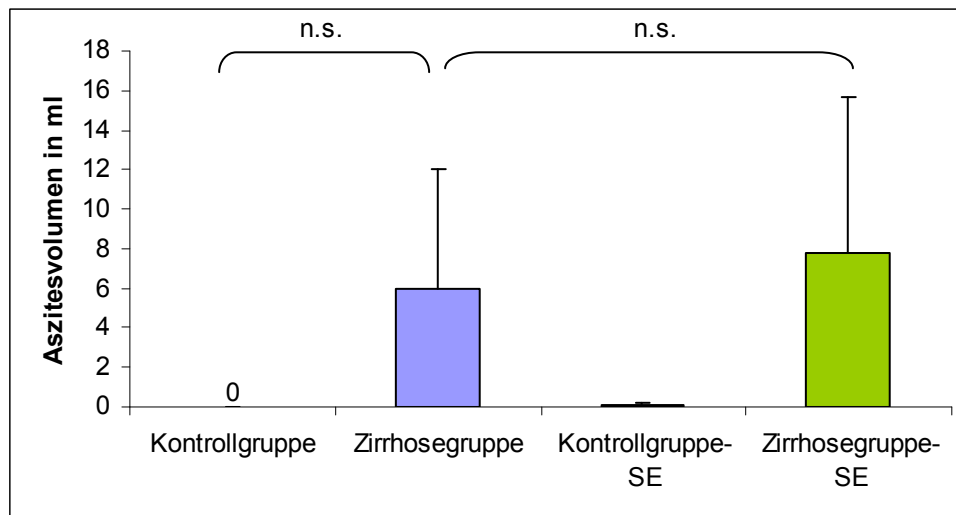
Zirrhoseratten vs. Kontrollratten:  $1,83\text{g} \pm 0,82\text{g}$  vs.  $0,76\text{g} \pm 0,05\text{g}$ ;  $*p=0,008$ .

Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie:  $1,83\text{g} \pm 0,82\text{g}$  vs.  $2,06\text{g} \pm 0,43\text{g}$ ;  $p=0,44$ .

Das Gewicht der mesenterialen Lymphknoten sowie von Leber und Lunge wichen zwischen Zirrhosegruppe und Kontrollgruppe nicht signifikant voneinander ab. (Gewicht MLK: Zirr vs. Kon:  $0,2\text{g} \pm 0,08\text{g}$  vs.  $0,2\text{g} \pm 0,05\text{g}$ ;  $p=0,99$ . Lebergewicht: Zirr vs. Kon:  $10,50\text{g} \pm 4,15\text{g}$  vs.  $12,11\text{g} \pm 1,46\text{g}$ ;  $p=0,35$ . Lungengewicht: Zirr vs. Kon:  $1,48\text{g} \pm 0,22\text{g}$  vs.  $1,49\text{g} \pm 0,14\text{g}$ ;  $p=0,88$ ).

Auch im Vergleich der Zirrhosegruppe gegenüber der Zirrhosegruppe mit Sympathektomie zeigten Gewichte von mesenterialen Lymphknoten, Leber und Lunge keine signifikanten Unterschiede. (Gewicht MLK: Zirr vs. Zirr-SE  $0,2\text{g} \pm 0,08\text{g}$  vs.  $0,16\text{g} \pm 0,09\text{g}$ ;  $p=0,36$ . Lebergewicht: Zirr vs. Zirr-SE  $10,50\text{g} \pm 4,15\text{g}$  vs.  $12,22\text{g} \pm 5,63\text{g}$ ;  $p=0,48$ . Lungengewicht: Zirr vs. Zirr-SE  $1,48\text{g} \pm 0,22\text{g}$  vs.  $1,48\text{g} \pm 0,16\text{g}$ ;  $p=0,98$ ).

Der Unterschied des Aszitesvolumens erreichte im Vergleich der Zirrhosegruppe mit der Kontrollgruppe kein Signifikanzniveau ( $p=0,061$ ). Jedoch zeigte sich ein Trend zu höherem Aszitesvolumen bei den Zirrhosetieren. Im Vergleich des Aszitesvolumens zwischen der Zirrhosegruppe und der Zirrhosegruppe mit Sympathektomie wurde kein signifikanter Unterschied erfasst. (Graphik 3)



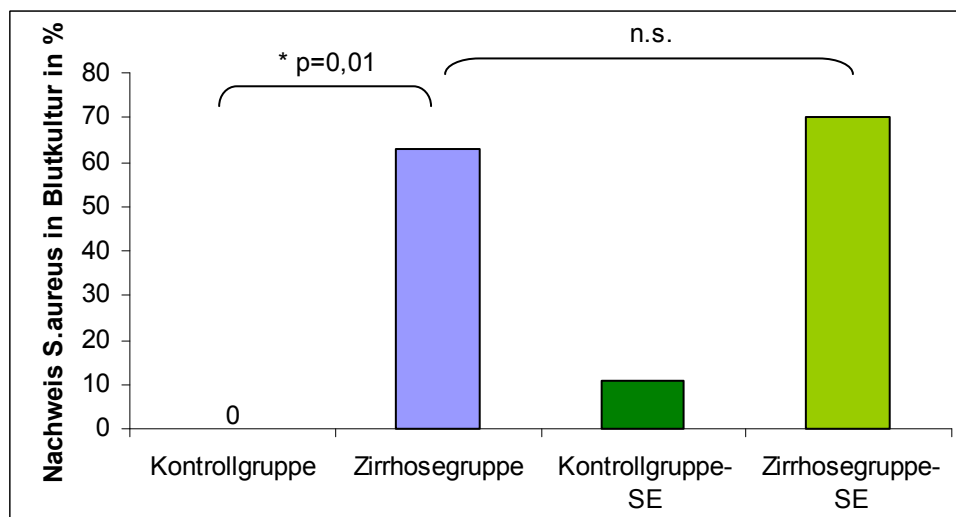
**Graphik 3: Aszitesvolumen:**

Zirrhoseratten vs. Kontrollratten:  $6\text{ml} \pm 7,61\text{ml}$  vs.  $0\text{ml} \pm 0\text{ml}$ ;  $p=0,061$ .

Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie:  $6\text{ml} \pm 7,61\text{ml}$  vs.  $7,82\text{ml} \pm 13,71\text{ml}$ ;  $p=0,74$ .

#### 4.3 Ergebnisse Bakteriämie

Der Vergleich des Nachweises einer Bakteriämie mit *S. aureus* zeigt in der Zirrhosegruppe signifikant häufiger ein Auftreten einer *S. aureus* Bakteriämie als in der Kontrollgruppe (\* $p=0,01$ ). Jedoch erweist sich in der Zirrhosegruppe die Sympathektomie nicht signifikant vorteilhaft im Vergleich mit der Zirrhosegruppe. (Graphik 4)

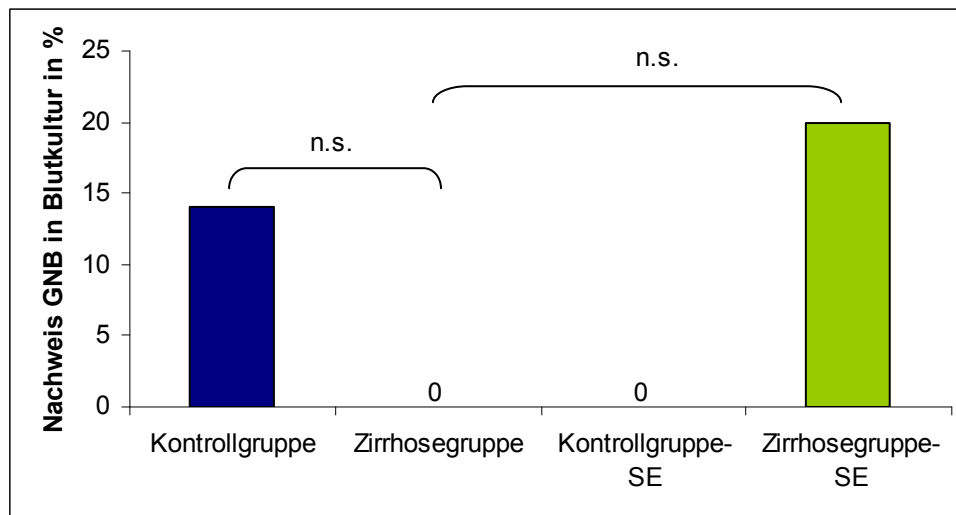


**Graphik 4: Nachweis einer Bakteriämie mit *S. aureus*:**

Zirrhosegruppe vs. Kontrollgruppe: 63% vs. 0%; \* $p=0,01$ .

Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit SE: 62% vs. 70%;  $p=0,76$ .

Betrachtet man den Nachweis einer spontanen Bakteriämie mit GNB zeigt der Vergleich der Zirrhosegruppe gegenüber der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied. Ebenfalls senkt die Sympathektomie nicht die Häufigkeit einer Bakteriämie mit GNB bei den Zirrhosetieren im Versuch der bakteriellen Belastung mit *S. aureus*. (Graphik 5)



**Graphik 5: Nachweis einer spontanen Bakteriämie mit GNB:**

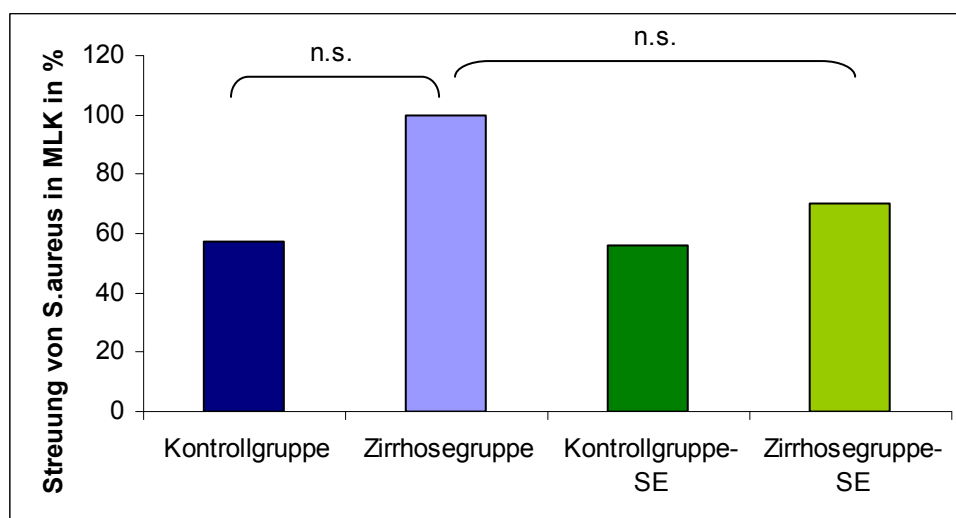
Zirrhosegruppe vs. Kontrollgruppe: 0% vs. 14%;  $p=0,36$ .

Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe-SE: 0% vs. 20%;  $p=0,17$ .

#### 4.4 Ergebnisse bakterieller Streuung und Belastung in mesenteriale Lymphknoten

Die bakterielle Streuung von *S. aureus* in mesenteriale Lymphknoten zeigt beim Vergleich der Zirrhosegruppe gegenüber der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied. Ebenfalls findet sich in der Zirrhosegruppe gegenüber der Zirrhosegruppe mit Sympathektomie kein signifikanter Unterschied beim Nachweis von *S. aureus* in MLK. (Graphik 6)

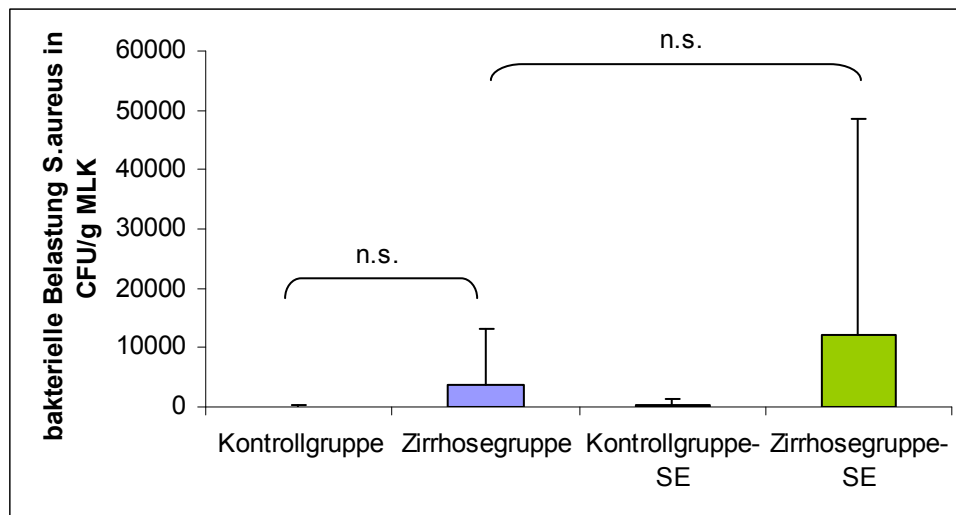
In der Analyse der bakteriellen Belastung, die in CFU/g mesenterialen Lymphknotens gemessen wurde, zeigt der Vergleich für *S. aureus* in der Zirrhosegruppe gegenüber der Kontrollgruppe keinen Unterschied auf Signifikanzniveau. Auch zwischen Zirrhosegruppe und Zirrhosegruppe mit Sympathektomie liegt kein statistischer Unterschied. (Graphik 7)



**Graphik 6: Nachweis der bakteriellen Streuung von *S. aureus* in mesenteriale Lymphknoten:**

Zirrhosegruppe vs. Kontrollgruppe: 100% vs. 57%;  $p=0,078$ .

Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie: 100% vs. 70%;  $p=0,81$ .



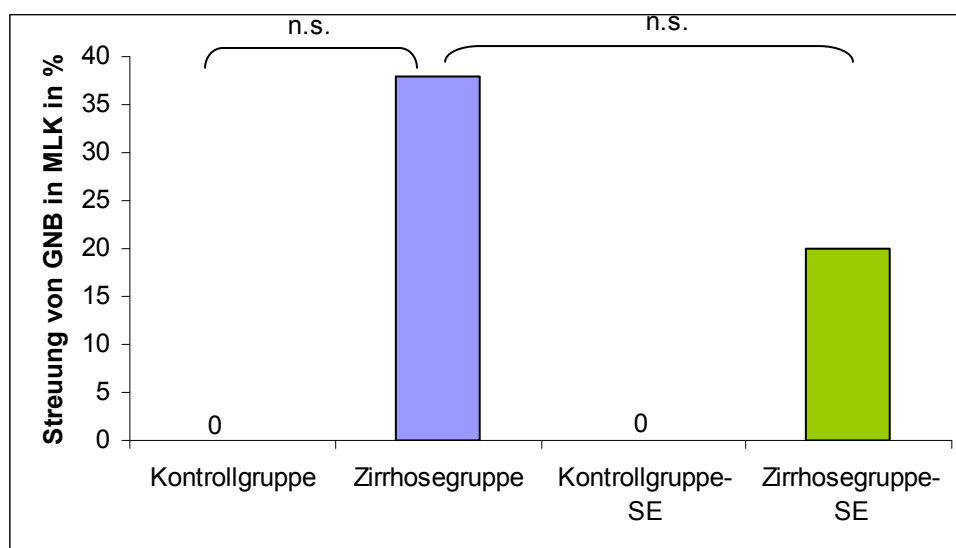
**Graphik 7: Bakterielle Belastung mit *S. aureus* in CFU/g mesenterialen Lymphknoten:**

Zirrhosegruppe vs. Kontrollgruppe: 3700 CFU/g ± 9383 CFU/g vs. 86 CFU/g ± 103 CFU/g;  $p=0,33$ .

Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit SE: 3700 CFU/g ± 9383 CFU/g vs. 12.055 CFU/g ± 36.406 CFU/g;  $p=0,54$ .

Beim Vergleich der Ausbreitung von GNB, die durch eine spontane bakterielle Translokation nachweisbar waren, zeigt der Vergleich der Zirrhosegruppe gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls keinen Unterschied auf Signifikanzniveau. Auch fehlt bei der Zirrhosegruppe gegenüber der Zirrhosegruppe mit Sympathektomie ein signifikanter Unterschied bei der bakteriellen Streuung von GNB. (Graphik 8)

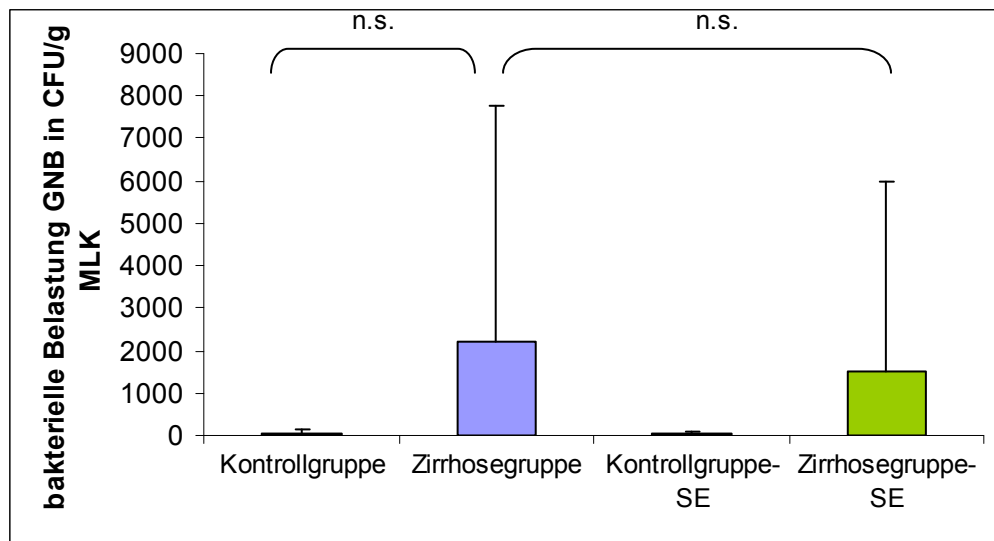
In der Analyse der bakteriellen Belastung mit GNB, die im Rahmen einer bakteriellen Translokation nachgewiesen wurde, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Zirrhosegruppe und der Kontrollgruppe. Das Gleiche gilt für den Vergleich Zirrhosegruppe gegenüber Zirrhosegruppe mit Sympathektomie. (Graphik 9)



**Graphik 8: Nachweis einer bakteriellen Streuung von GNB in mesenteriale Lymphknoten:**

Zirrhosegruppe vs. Kontrollgruppe: 38% vs. 0%;  $p=0,08$ .

Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie: 38% vs. 20%;  $p=0,44$ .



**Graphik 9: Bakterielle Belastung mit GNB in CFU/g mesenteriale Lymphknoten:**

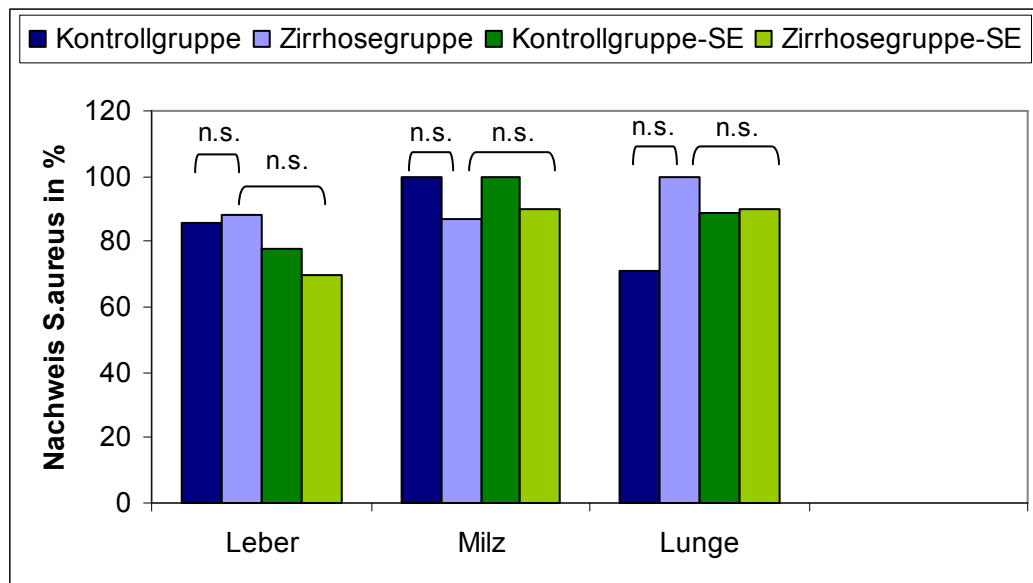
Zirrhosegruppe vs. Kontrollgruppe: 2221 CFU/g ± 5544 CFU/g vs. 38 CFU/g ± 101 CFU/g;  $p=0,32$ .

Zirrhosegruppe vs. Zirrrosegruppe mit Sympathektomie: 2221 CFU/g ± 5544 CFU/g vs. 1511 CFU/g ± 4496 CFU/g;  $p=0,78$ .

#### 4.5 Ergebnisse bakterieller Streuung und Belastung in Milz, Leber und Lunge

Die Häufigkeiten eines Nachweises von *S. aureus* im Milz-, Leber- und Lungenhomogenisat zeigen im Vergleich der Kontrollgruppe gegenüber der Zirrhosegruppe keine signifikanten Unterschiede. Der Vergleich der Zirrhosegruppe gegenüber der Zirrhosegruppe mit Sympathektomie zeigt für die Ausbreitung von *S. aureus* in Milz, Leber und Lunge keine signifikanten Unterschiede. (Graphik 10)

In der Analyse der bakteriellen Belastung mit *S.aureus* zeigte sich in der Milz, der Leber sowie der Lunge im Vergleich der Zirrhosegruppe gegenüber der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied. Ebenfalls zeigt der Vergleich der bakteriellen Belastung mit *S.aureus* bei der Zirrhosegruppe gegenüber der Zirrhosegruppe mit Sympathektomie keine signifikanten Unterschiede für Milz-, Leber- und Lungengewebe. (Graphik 11)

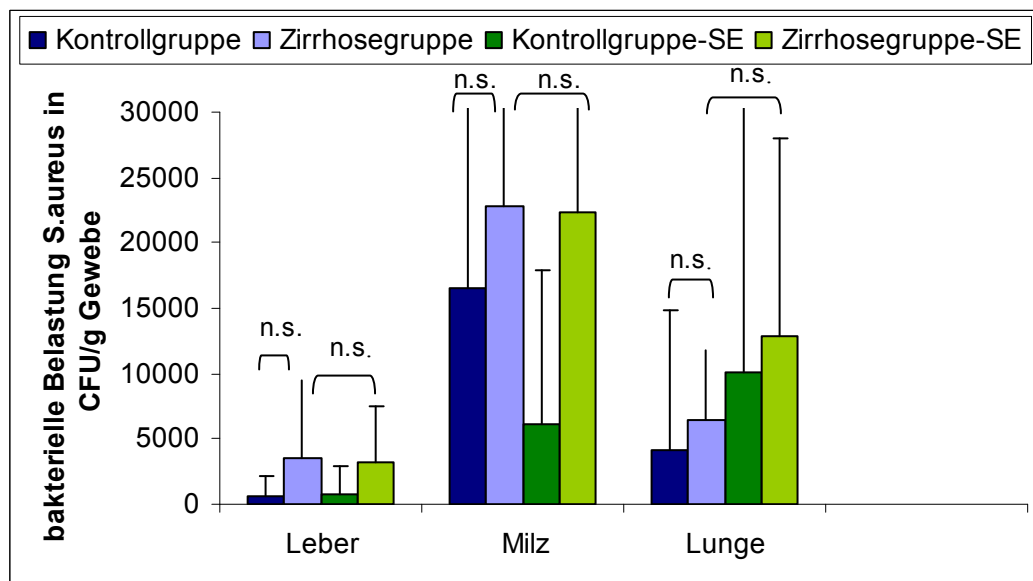


**Graphik 10: Nachweis einer bakteriellen Streuung von *S. aureus* in Leber-, Milz- und Lungengewebe:**

**Leber:** Kontrollgruppe vs. Zirrhosegruppe: 88% vs. 86%;  $p=0,93$ . Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie: 88% vs. 70%;  $p=0,41$ .

**Milz:** Kontrollgruppe vs. Zirrhosegruppe: 100% vs. 88%;  $p=0,35$ . Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie: 88% vs. 90%;  $p=0,88$ .

**Lunge:** Kontrollgruppe vs. Zirrhosegruppe: 71% vs. 100%;  $p=0,17$ . Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie: 100% vs. 90%;  $p=0,39$ .



**Graphik 11: Bakterielle Belastung von *S. aureus* in Leber-, Milz und Lungengewebe:**

**Leber:** Zirrhosegruppe vs. Kontrollgruppe: 3544 CFU *S. aureus* / g Lebergewebe  $\pm$  SD 6015 CFU *S. aureus*/g Lebergewebe vs. 629 CFU *S. aureus* /g Lebergewebe  $\pm$  SD 1444 CFU *S. aureus*/g Lebergewebe;  $p=0,235$ .

Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie: 3544 CFU *S. aureus*/g Lebergewebe  $\pm$  SD 6015 CFU *S. aureus*/g Lebergewebe vs. 3280 CFU *S. aureus*/g Lebergewebe  $\pm$  SD 4295 CFU *S. aureus*/g Lebergewebe;  $p=0,915$ .

**Milz:** Zirrhosegruppe vs. Kontrollgruppe: 22775 CFU *S. aureus*/g Milzgewebe  $\pm$  SD 27541 CFU *S. aureus*/g Milzgewebe vs. 16500 CFU *S. aureus*/g Milzgewebe  $\pm$  SD 33205 CFU *S. aureus*/g Milzgewebe;  $p=0,695$ .

Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie: 22775 CFU *S. aureus*/g Milzgewebe  $\pm$  SD 27541 CFU *S. aureus*/g Milzgewebe vs. 22360 CFU *S. aureus*/g Milzgewebe  $\pm$  SD 41567 CFU *S. aureus*/g Milzgewebe;  $p=0,981$ .

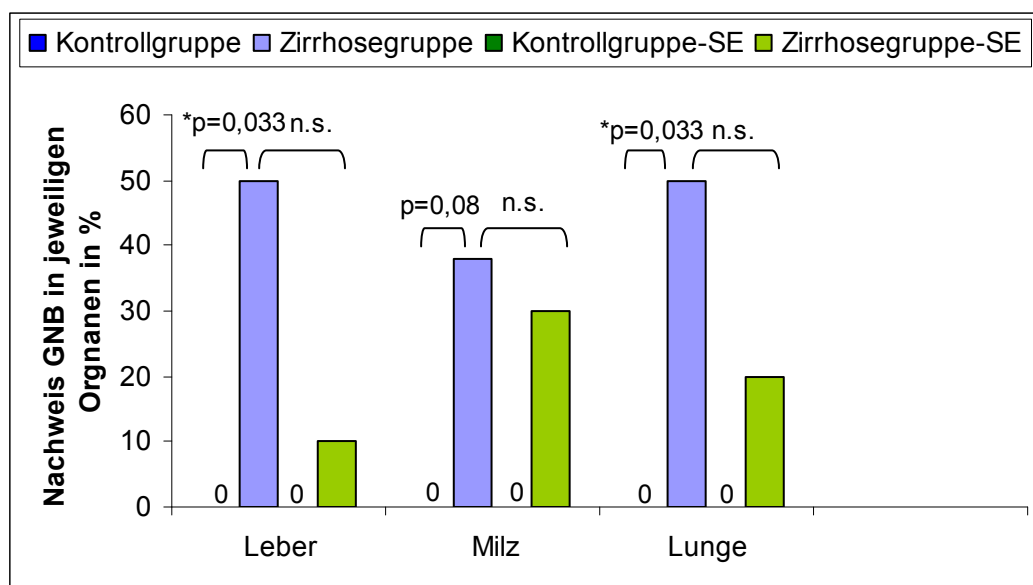
**Lunge:** Zirrhosegruppe vs. Kontrollgruppe: 6356 CFU *S. aureus*/g Lungengewebe  $\pm$  SD 5387 CFU *S. aureus*/g Lungengewebe vs. 4193 CFU *S. aureus*/g Lungengewebe  $\pm$  SD 10698 CFU *S. aureus*/g Lungengewebe;  $p=0,622$ .

Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie: 6356 CFU *S. aureus*/g Lungengewebe  $\pm$  SD 5387 CFU

*S.aureus*/g Lungengewebe vs. 12795 CFU *S.aureus* /g Lungengewebe  $\pm$  SD 15257 CFU *S.aureus*/g Lungengewebe;  $p=0,239$ .

Der Vergleich der Zirrhosegruppe gegenüber der Kontrollgruppe ergibt einen signifikant häufigeren Nachweis von GNB in Gewebeproben von Leber (\* $p=0,033$ ) und Lunge (\* $p=0,033$ ). Eine signifikant unterschiedliche Streuung von GNB fand sich jedoch nicht im Vergleich der Zirrhosegruppe gegenüber der Kontrollgruppe in der Milz.

Ebenfalls zeigt der Vergleich der Zirrhosegruppe gegenüber der Zirrhosegruppe mit Sympathektomie keine signifikanten Unterschiede in der Ausbreitung von GNB in Milz, Leber und Lunge.



**Graphik 12: Nachweis einer bakteriellen Streuung von GNB in Milz-, Leber- und Lungengewebe**

**Leber:** Zirrhosegruppe vs. Kontrollgruppe: 50% vs. 0%; \* $p=0,033$ . Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie: 50% vs. 10%;  $p=0,09$ .

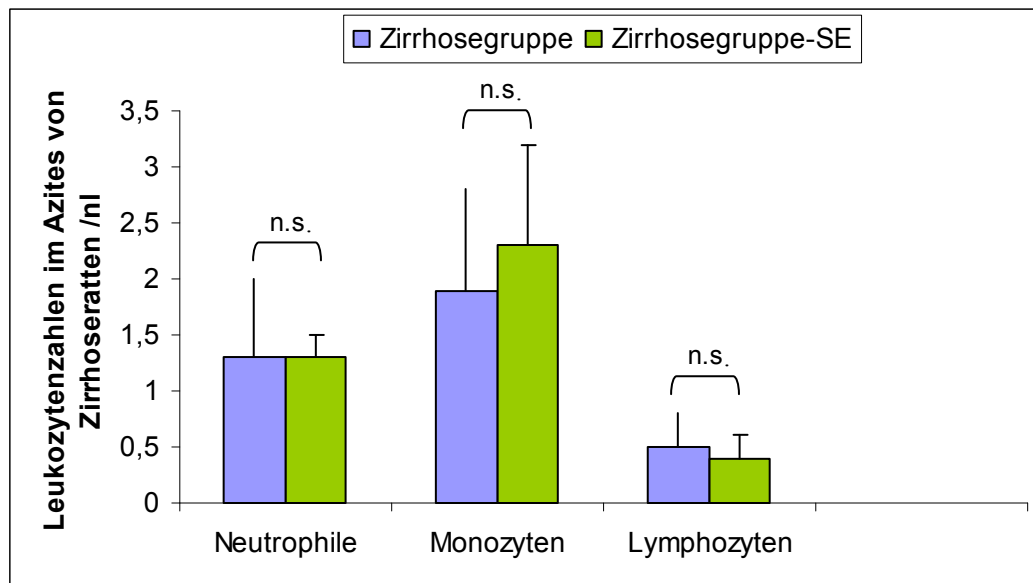
**Milz:** Zirrhosegruppe vs. Kontrollgruppe: 38% vs. 0%;  $p=0,08$ . Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie: 38% vs. 30%;  $p=0,76$ .

**Lunge:** Zirrhosegruppe vs. Kontrollgruppe: 50%  $\pm$  0%; \* $p=0,033$ . Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit Sympathektomie: 50% vs. 20%;  $p=0,20$ .

#### 4.6 Ergebnisse der Leukozytenzahlen im Aszites von Zirrhoseratten

In der Zirrhosegruppe mit Sympathektomie wurden keine signifikant veränderten Leukozytenzahlen im Aszites nach bakterieller Belastung mit *S. aureus* beobachtet.





**Graphik 13: Leukozytenzahlen im Aszites von Zirrhoseratten nach Belastung mit *S. aureus*:**

**Neutrophile:** Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit SE:  $1,3 \pm 0,7$  vs.  $1,3 \pm 0,2$ ;  $p > 0,05$ .

**Monozyten:** Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit SE:  $1,9 \pm 0,9$  vs.  $2,3 \pm 0,9$ ;  $p > 0,05$ .

**Lymphozyten:** Zirrhosegruppe vs. Zirrhosegruppe mit SE  $0,5 \pm 0,3$  vs.  $0,4 \pm 0,2$ ;  $p > 0,05$ .

## 5. DISKUSSION

### Einleitung

Das Zusammenspiel zwischen Sympathikushyperaktivität und vermehrter Infektionsanfälligkeit im Rahmen der Leberzirrhose ist bislang wenig untersucht. Dabei sind immunmodulatorische Effekte des sympathischen Transmitters Noradrenalin vielfach beschrieben<sup>72-76</sup> und interessanterweise hat eine Meta-Analyse von 2009 gezeigt, dass Propranolol – unabhängig von hämodynamischen Verbesserungen – zur Prophylaxe einer spontan bakteriellen Peritonitis bei Leberzirrhosepatienten mit Aszites wirksam ist.<sup>36</sup> Als Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit daher formuliert, dass eine splanchnikuspezifische Sympathektomie bei Leberzirrhose die Ausbreitung einer experimentellen intraperitonealen Infektion, hier im Experiment mit *S. aureus*, reduziert.

### Ausgangsparameter der Versuchsgruppen

Die Ergebnisse zeigen zunächst einen signifikanten Unterschied des Körpergewichts der Ratten der Zirrhosegruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Graphik 1; \* $p=0,005$ ). Jedoch erfolgte initial die Auswahl von Kontrolltieren gewichtsadaptiert zum Zeitpunkt, an dem die Tiere der Zirrhosegruppe Aszites entwickelten. Dennoch entwickelte sich innerhalb der nächsten vier Wochen nach durchgeführter Sympathektomie bis zur Ausbildung der funktionellen Sympathektomie ein signifikanter Gewichtsunterschied. Dieser lässt sich durch eine in der Zirrhosegruppe krankheitsbedingte geringere Gewichtszunahme erklären. Wie die Ergebnisse zeigen, führte die Sympathektomie nicht per se zur Gewichtsabnahme, da der Vergleich der Zirrhosegruppe gegenüber der Zirrhosegruppe mit Sympathektomie keinen signifikanten Gewichtsunterschied ergibt (Graphik 1;  $p=0,84$ ).

Das Milzgewicht der Leberzirrhosegruppe ist signifikant größer als das der Kontrollgruppe (Graphik 2, \* $p=0,008$ ). Ein erhöhtes Milzgewicht steht vermutlich über eine erhöhte Milzperfusion im Zusammenhang mit Ausbildung der portalen Hypertension bei Leberzirrhose.<sup>92</sup> Für das gemessene Aszitesvolumen zeigt sich eine Tendenz in der Zirrhosegruppe mit größerer Aszitesmenge als in der Kontrollgruppe, wobei der Unterschied knapp nicht ein Signifikanzniveau erreicht (Graphik 3;  $p=0,061$ ).

Letztlich kann davon ausgegangen werden, dass bei signifikantem Unterschied des Körpergewichts, signifikant schwererer Milz und grenzwertig mehr Aszites ein dekompensiertes Zirrhosestadium im Rattenmodell erreicht wurde.

### Infektionsabwehr in der Zirrhosegruppe

Die Versuchsergebnisse zeigen zunächst eine reduzierte Infektionsabwehr in der Zirrhosegruppe. So tritt nach intraperitonealer Applikation von *S. aureus* eine Bakteriämie mit *S. aureus* in der Zirrhosegruppe signifikant häufiger auf als in der Gruppe der Kontrollratten (Graphik 4; \*p=0,01). Ebenfalls wird ein signifikant häufigerer Nachweis von gramnegativen Bakterien in Leber (\*p=0,033) und Lunge (\*p=0,033) bei den Ratten der Zirrhosegruppe gegenüber den gesunden Kontrollratten beobachtet (Graphik 12).

Diese Versuchsergebnisse spiegeln im vorliegenden Tierexperiment die für Patienten mit Leberzirrhose erhöhte Häufigkeit bakterieller Infektionen wieder, welche mit 32-34% bei Leberzirrhose deutlich höher beschrieben wird als mit 5-7% in der allgemeinen Krankenhauspopulation.<sup>3, 4</sup>

### Auswirkung der splanchnikusspezifischen Sympathektomie auf die systemische Streuung von *Staphylococcus aureus* und gramnegativen Erregern

Die splanchnikusspezifische Sympathektomie bewirkt bei den Zirrhoseratten nicht wie in der Hypothese angenommen eine signifikante Reduktion der Ausbreitung von *S. aureus* in mesenteriale Lymphknoten, Milz, Leber und Lunge (Graphik 10, Graphik 11). Ebenfalls zeigen die Blutkulturergebnisse der Zirrhoseratten in diesem Vergleich keine signifikante Reduktion für den positiven Nachweis von *S. aureus* in der Sympathektomiegruppe (Graphik 4). Darüber hinaus zeigte sich durch eine Sympathektomie kein Unterschied der Leukozytenzahlen im Aszites der Zirrhosetiere (Graphik 13).

Jedoch beobachteten auch andere Autoren im Experiment zur Auswirkung einer Sympathektomie an Mäusen keinen reduzierenden Effekt der Sympathektomie für die Ausbreitung einer intraperitonealen Infektion mit *S. aureus*, sondern entgegengesetzt einen negativen Einfluss der Sympathektomie mit vermehrter systemischer bakterieller Belastung.<sup>93</sup> Ursächlich hierfür könnte die kortikosteroid vermittelte Sekretion von Interleukin 4 sein, welche für die Abwehr von *S.aureus* bedeutsam erscheint.<sup>93, 94</sup> Für einen adäquaten Kortikosteroidspiegel wiederum ist eine sympathische Aktivität Voraussetzung.<sup>95-97</sup>

Somit ist die in vorliegender Arbeit gezeigte Widerlegung der Hypothese einerseits konform mit anderen experimentellen Ergebnissen als auch konform mit in verschiedenen Studien beschriebenen physiologischen Grundlagen.

Vorliegende Versuchsergebnisse wonach die Sympathektomie die Ausbreitung der intraperitonealen Infektion mit *S. aureus* bei Leberzirrhose im Rattenmodel nicht reduziert,

stehen ebenfalls nicht deutlich im Widerspruch zu den Ergebnissen der Metaanalyse zur SBP-Prophylaxe mit dem nicht selektiven  $\beta$ -Blocker Propranolol. Durch die Definition einer SBP als Nachweis von  $\geq 250$  polymorphonukleäre Zellen/mm<sup>3</sup> Aszites bzw. als Nachweis eines bakteriellen Erregers in der Asziteskultur, wurde in der Metaanalyse möglicherweise die zunehmend an Bedeutung gewinnende grampositive SBP nicht erfasst. So zeigte eine klinische Studie, dass bis zu 90% der Leberzirrhosepatienten mit grampositiver spontan bakterieller Peritonitis anfänglich nur weniger als 250 polymorphonukleäre Zellen/mm<sup>3</sup> Aszites aufweisen.<sup>98</sup>

Die Ergebnisse zur endogenen gramnegativen Infektion, die im Versuch der *S. aureus* Belastung zeitgleich beobachtet wurde, zeigen, dass die Sympathektomie in der Gruppe der Zirrhosetiere die Tendenz für ein reduziertes Auftreten einer gramnegativen bakteriellen Streuung bewirkt, jedoch wird hierbei kein statistisch signifikantes Level erreicht (Graphik 8 und Graphik 12).

Diese Beobachtung für gramnegative Erreger deckt sich mit Ergebnissen aus einem äquivalenten Experiment an Zirrhoseratten bei dem eine intraperitoneale Applikation von markierten *E.coli* erfolgte und gezeigt werden konnte, dass die Sympathektomie die Ausbreitung von *E.coli* in mesenteriale Lymphknoten, Milz, Leber, Lunge und Blutkulturen signifikant reduziert.<sup>99</sup> Eine signifikante Reduktion der bakteriellen Streuung der gramnegativen Erreger *E.coli* sowie *P. aeruginosa* wurde auch bei einer Sympathektomie im Experiment mit Mäusen beobachtet.<sup>93</sup>

#### Immunabwehr von gramnegativen und grampositiven Bakterien

Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit zur Auswirkung einer Sympathektomie für die Ausbreitung von *S. aureus* sowie zusätzlich für endogen translozierte gramnegative Bakterien werden durch allgemeine, grundsätzliche Unterschiede der Infektionsabwehr von gramnegativen und grampositiven Bakterien pathophysiologisch untermauert.

Untersuchungen zeigen, dass Monozyten über einen CD-14-Rezeptor je nach Bakterium differente Signalkaskaden auslösen.<sup>100</sup> Während die Zytokinantwort im Rahmen einer gramnegativen Infektion schnell erfolgt und proinflammatorische Zytokine wie Il-1, Il-6, Il-8 sowie TNF $\alpha$  dominieren, läuft die Zytokinantwort der grampositiven Infektion langsamer vonstatten und hier dominieren Lymphotoxin  $\alpha$  (früher TNF $\beta$ ) und Interferon  $\gamma$ .<sup>100</sup> Diese Untersuchungen erfolgten im Rahmen der Sepsisforschung nachdem festgestellt werden

musste, dass gleiche antiinflammatorische Therapieansätze bei grampositiver und gramnegativer Sepsis zu unterschiedlichen Erfolgen führten und dafür Ursachen gesucht wurden.<sup>101</sup> Interessanterweise zeigen die Untersuchungen zur antiinflammatorischen Therapie deutlich, dass Unterschiede in der Infektionsabwehr von gramnegativen und grampositiven Erregern von relevanter klinischer Bedeutung sein können.

Ebenfalls unabhängig von der Sympathektomie ist bei den vorliegenden Versuchsergebnissen zu bedenken, dass in diesem Experiment eine Kombination aus experimenteller Belastung mit *S. aureus* und endogener gramnegativer Infektion vorgelegen hat. Dies könnte möglicherweise zu Veränderungen in der Infektionsabwehr geführt haben. In der Literatur findet sich hierzu eine Veröffentlichung, bei der an Mäusen gezeigt werden konnte, dass die Translokation von oral verabreichtem *S. aureus* in extraintestinales Gewebe bei gleichzeitiger oraler Gabe von *E.coli* erleichtert ist.<sup>102</sup> In diesem Experiment wurde vermutet, dass die Translokation von *S. aureus* parazellulär aus dem Darmlumen durch die intestinale epitheliale Barriere in Anwesenheit von *E.coli* erleichtert erfolgt.<sup>102</sup> Dieser Ablauf ist für unser Experiment vermutlich eher von untergeordneter Bedeutung, da die Ausbreitung von *S.aureus* am ehesten aus der Peritonealhöhle in die mesenterialen Lymphknoten stattfand. Ob also eine veränderte Infektionsabwehr bei simultaner grampositiver und gramnegativer Infektion in unserem Experiment eine Rolle gespielt haben könnte, bleibt zu hinterfragen.

### Schlussfolgerung

Vorliegende Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass das Leberzirrhosemodell der Ratte keine Hinweise liefert, dass eine  $\beta$ -Blockertherapie als Prophylaxe speziell der häufiger werdenden grampositiven spontanen bakteriellen Peritonitis mit *S. aureus* dienen könnte. Die Ergebnisse dieses Experiments zur Auswirkung einer splanchnikusspezifischen Sympathektomie für die Ausbreitung einer Infektion mit *S. aureus* bei Ratten mit Leberzirrhose verdeutlichen klinisch relevante Unterschiede der Sympathikusaktivität bei der Infektionsabwehr von gramnegativen Bakterien und grampositiven Bakterien.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Für Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose werden bakterielle Infektionen in 30-50% als direkt ursächlich für das Versterben beschrieben.<sup>5</sup> Überwiegend sind gramnegative Darmbakterien Auslöser der Infektionen im Rahmen der Grunderkrankung Leberzirrhose<sup>4</sup>, jedoch werden zunehmend auch grampositive Kokken als Infektionserreger nachgewiesen.<sup>4</sup>

Das Zusammenspiel zwischen vermehrter Infektionsanfälligkeit und einer bei Leberzirrhose beobachteten, splanchnikusbetonten Sympathikushyperaktivität ist experimentell bislang wenig untersucht. Jedoch sind immunmodulatorische Effekte des sympathischen Transmitters Noradrenalin vielfach beschrieben.<sup>72-76</sup> Interessanterweise zeigt eine Meta-Analyse von 2009, dass der nicht selektive  $\beta$ -Blocker Propranolol zur Prophylaxe einer spontan bakteriellen Peritonitis bei Leberzirrhosepatienten mit Aszites wirksam ist.<sup>36</sup> Als Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit daher formuliert, dass eine splanchnikusspezifische Sympathektomie bei Leberzirrhose die Ausbreitung einer experimentellen intraperitonealen Infektion mit *S. aureus* reduziert. Für diese Fragestellung wurde ein Tiermodell der Ratte mit experimenteller, Tetrachlorkohlenstoff induzierter Leberzirrhose gewählt. Durch intraperitoneale Injektion des anti-Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase-Saporin-Immunotoxins, das zu einem selektiven Zelltod noradrenerger Neuronen führt, wurde eine splanchnikusspezifische Sympathektomie induziert.

Jedoch wurde die Hypothese im vorliegenden Versuch widerlegt. Ursächlich hierfür ist möglicherweise eine kortikosteroid vermittelte Il-4-Sekretion, welche für die Abwehr von *S.aureus* bedeutsam erscheint<sup>93, 94</sup> und vermutlich nur bei ausreichender Sympathikusaktivität erfolgen kann.<sup>95-97</sup> Betrachtet man die endogene bakterielle Translokation mit gramnegativen Bakterien, die im Versuch der *S. aureus* Belastung, beobachtet wurde, zeigt die Sympathektomie jedoch die Tendenz für ein reduziertes Auftreten einer gramnegativen bakteriellen Streuung.

Die Beobachtungen zur Auswirkung einer Sympathektomie im Zirrhosemodell – ohne protektiven Effekt im Rahmen einer grampositiven Infektion und tendenziell protektiv im Rahmen einer gramnegativen Infektion – verdeutlichen Unterschiede der Infektionsabwehr von gramnegativen und grampositiven Bakterien. Während die Zytokinantwort im Rahmen einer gramnegativen Infektion schnell erfolgt und proinflammatorische Zytokine dominieren, läuft die Zytokinantwort der grampositiven Infektion langsamer vonstatten und hier dominieren Lymphotoxin  $\alpha$  und Interferon  $\gamma$ .<sup>100</sup>

Zusammenfassend lässt sich aus vorliegenden Ergebnissen schlussfolgern, dass zumindest das

Leberzirrhosemodell der Ratte keine Hinweise liefert, dass eine „immunmodulatorische“  $\beta$ -Blockertherapie als Prophylaxe der häufiger werdenden grampositiven spontanen bakteriellen Peritonitis dienen könnte. Hierfür sind vermutlich klinisch relevante Unterschiede der Sympathikusaktivität für die Infektionsabwehr von gramnegativen Bakterien und grampositiven Bakterien mit ursächlich.

## SUMMARY

Bacterial infections directly cause death in 30-50% of patients suffering from cirrhosis of the liver.<sup>5</sup> In a majority of these patients mainly gram-negative bacteria have been isolated,<sup>4</sup> however, recently an increasing isolation of gram-positive cocci was found as well.<sup>4</sup>

The interaction between the susceptibility to bacterial infection and a sympathetic hyperactivity especially in the splanchnic region in liver cirrhosis is rarely investigated. However, immunomodulation by the sympathetic transmitter noradrenalin is frequently described.<sup>72-79</sup> Surprisingly, a meta analysis which was done in 2009 stated that propranolol is effective in the prophylaxis of spontaneous bacterial infection in patients with liver cirrhosis.<sup>36</sup> In this study it was therefore postulated that sympathectomy in the splanchnic region would reduce the burden of an experimental intraperitoneal infection with *S. aureus*. To further proof this hypothesis an experimental model of rats exposed to carbon tetrachloride to induce liver cirrhosis was chosen. Splanchnic sympathectomy was induced by intraperitoneal injection of an anti-dopamin  $\beta$ -hydroxylase-saporin-immunotoxin to cause selective cell death of noradrenergic neurons.

However, this experiment has not been able to proof the aforementioned hypothesis. It is assumed that this effect is due to a corticosteroid mediated secretion of interleukin 4, that is important for the defence of *S. aureus*<sup>93, 93</sup> and that is suspected to be dependent on an adequate level of sympathetic activity.<sup>95-97</sup>

On the other hand an endogenous bacterial translocation of gram-negative bacteria which was detected in this experiment, sympathectomy showed a tendency to reduce bacterial burden.

The observation on the effect of sympathectomy in a model of cirrhosis of the liver – failing to reduce bacterial burden in gram-positive infection and showing a tendency to protect against bacterial burden in gram-negative infection – probably shows relevant differences in the defence of gram-negative and gram-positive bacteria. The release of cytokines in gram-negative infection is very fast and dominated by proinflammatory cytokines, while the release of cytokines in gram-positive infection is slower and dominated by lymphotoxin  $\alpha$  and interferon  $\gamma$ .<sup>100</sup>

In summary, the experiments have shown that rats with cirrhosis of the liver are not an appropriate model for  $\beta$ -blockers to be used as an effective prophylaxis for the increasing number of gram-positive bacterial peritonitis. A clinically relevant difference of the sympathetic activity may be fundamental in the defence of gram-positive and gram-negative bacteria.



## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Wyke RJ. Problems of bacterial infection in patients with liver disease. *Gut* 1987; 28:323-41.
2. Navasa M, Rimola A, Rodes J. Bacterial infection in liver disease. *Sem Liver Dis* 1997; 17:323-32
3. Brozio M, Salerno F, Cazzaniga M. Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. *Digest Liver Dis* 2001; 33:41-8.
4. Fernández J, Navasa M, Gómez J. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002; 35:140-48.
5. Wong F, Bernardi M, Balk R, Christman B, Moreau R, Garcia-Tsao G, Patch D, Soriano G, Hoefs J, Navasa M. Sepsis in cirrhosis: report on the 7<sup>th</sup> meeting of the international ascites club. *Gut* 2005; 54:718-725.
6. Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatology* 1993; 18:353-58.
7. Wilcox CM, Dismukes WE. Spontaneous bacterial peritonitis. A review of pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Medicine (Baltimore)*. 1987; 66(6):447-56.
8. Bac DJ, Siem M, Blankenstein M. Spontaneous bacterial peritonitis complicating malignancy-related ascites. *Dig Dis Sci* 1996; 41(1):131-32.
9. Chuang TF, Kao SC, Tsai CJ, Lee CC, Chen KS. Spontaneous bacterial peritonitis as the presenting feature in an adult with nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(1):181-2.
10. Runyon BA, Squier S, Brozio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatology* 1994; 21:792-796.
11. Garcia-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartin R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *J Gastroenterology* 1995; 108:1835-41.
12. Llovet JM, Bartoli R, March F, Planas R, Vinado B, Cabré E, et al. Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *J Hepatology* 1998; 28:307-313.
13. Cirera I, Bauer TM, Navasa M et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatology* 2001; 34:32-7.
14. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23:403-411.

15. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41:422-433.
16. O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, et al. Microbiology of the bacterial translocation in humans. *Gut* 1998; 42:29-35.
17. Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997; 26:1372-1378.
18. Casafont F, De las Heras G, Martín L, López MJ, Ledesma F, Pons F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1995; 40:1252-1256.
19. Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small intestinal dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998; 28:1187-1190.
20. Chesta J, Defilippi C, Defilippi C. Abnormalities in proximal small bowel motility in patients with liver cirrhosis. *J Hepatology* 1993; 17:828-832.
21. Runkel NSF, Moody FG, Smith GS, Rodriguez LF, Chen Y, Larocco MT, Miller TA. Alterations in rat intestinal transit by morphine promote bacterial translocation. *Dig Dis Sci* 1993; 38:1530-1536.
22. Prado A, Bartoli R, Lorenzo-Zúñiga V, Planas R, Viñado B, Riba J, et al. Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31:858-863.
23. Astdal G, Strosselli E. Peroral biopsy of the intestinal mucosa in hepatic cirrhosis. *Am J Dig Dis* 1960; 5:603-612.
24. Norman DA, Atkins JM, Seelig LL, Gómez C, Krejs GJ. Water and electrolyte movement and mucosal morphology in the jejunum of patients with portal hypertension. *Gastroenterology* 1980; 79:707-715.
25. Such J, Guardiola JV, de Juan Joaquin, Casellas JA, Pascual S, Aparicio JR, et al. Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14:1-6.
26. Berg RD, Wommack E, Deutsch EA. Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. *Arch Surg* 1988; 123(11):1359-64.
27. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004; 303:1662-65.
28. Grange JD, Roulot D, Pelletier G, Pariente EA, Denis J, Ink O, Blanc P, Rachard JP, Vinel JP, Delisle F, Fischer D, Flahault A, Amiot X. Norflaxacin primary prophylaxis of bacterial infections in cirrhotic patients with ascites: a double-blind randomized trial. *J Hepatology* 1998; 29:490-4.

29. Terg R, Fassio E, Guevara M, Cartier M, Longo C, Lucero R, Landeira C, Romero G, Dominguez N, Munoz A, Levi D, Miguez C, Abecasis R. Ciprofloxacin in primary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: A randomized, placebo-controlled study. *J Hepatology* 2008; 48:774-79.
30. Cohen MJ, Sahar T, Benenson S, Elinav E, Brezis M, Soares-Weiser K. Antibiotic prophylaxis for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites, without gastro-intestinal bleeding. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 15: CD004791.
31. Dupeyron C, Mangeney N, Sedrati L, Campillo B, Fouet P, Leluan G. Rapid emergence of quinolone resistance in cirrhotic patients treated with norfloxacin to prevent spontaneous bacterial peritonitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38:340-4.
32. Zhang SC, Wang W, Ren WY, He BM, Zhou K, Zhu WN. Effect of cisapride on intestinal bacterial and endotoxin translocation in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9:534-38.
33. Sandhu BS, Gupta R, Sharma J, Singh J, Murthy NS, Sarin SK. Norfloxacin and cisapride combination decreases the incidence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic ascites. *J Gastroenterology and Hepatology* 2005; 20:599-605.
34. Perez-Paramo M, Munoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, Ortiz-Berrocal J. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatology* 2000; 31:43-8.
35. Laleman W, Landeghem L, Wilmer A, Fevery J, Nevens F. Portal hypertension: from pathophysiology to clinical practice. *Liver Int* 2005; 25:1079-90.
36. Senzolo M, Cholongitas E, Burra P, Leandro G, Thalheimer U, Patch D, Burroughs AK. Beta-Blockers protect against spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients: a meta-analysis. *Liver Int* 2009; 29(8):1189-93.
37. Dempsey PW, Vaidya SA, Cheng G. The art of war: innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:2604-21.
38. Manigold T, Böcker U, Hanck C, Gundt J, Traber P, Antoni C, et al. Differential expression of toll-like-receptors 2 and 4 in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:275-282.
39. Riordan SM, Skinner N, Nagree A, McCallum H, McIver CJ, Kurtovic J, et al. Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. *J Hepatology* 2003; 37:1154-64.
40. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nölchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *J Gastroenterology* 1992; 103(1):264-74.
41. Djaldetti M, Salman H, Bergman M, Djaldetti R, Bessler H. Phagocytosis – the mighty weapon of the silent warriors. *Microsc Res Tech* 2002; 57(6):421-21.
42. Andrews T, Sullivan KE. Infections in patients with inherited defects in phagocytic

function. Clin Microbiol Rev 2003; 16:597-621.

43. Chonchol M. Neutrophil dysfunction and infection risk in end-stage-renal disease. Sem Dial 2006; 19:291-6.
44. Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagozytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. J Hepatology 1986; 6(2):252-62.
45. Feliu E, Gougerot MA, Hakim J, et al. Blood polymorphonuclear dysfunction in patients with alcoholic cirrhosis. Eur J Clin Invest 1977; 7(6):571-7.
46. De Fernandez MA, Clark A, Triger DR. Neutrophil phagozytic and bactericidal function in primary biliary cirrhosis and other chronic liver diseases. Clin Exp Immunol 1987; 67(3):655-61.
47. Hassner A, Kletter Y, Shlag D, Yedvab M, Aronson M, Shibolet S. Impaired monocyte function in liver cirrhosis. Br Med J (Clin Res Ed) 1981; 282(6272):1262-3.
48. Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. J Infect Dis 2000; 182(2):526-33.
49. Garcia-Gonzalez M, Boixeda D, Herrero D, Burgaleta C. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on leukocyte function in cirrhosis. J Gastroenterology 1993; 105(3):527-31.
50. Mellencamp MA, Preheim LC. Pneumococcal pneumonia in a rat model of cirrhosis: effects of cirrhosis on pulmonary defence mechanisms against Streptococcus pneumoniae. J Infect Dis 1991; 163(1):102-8.
51. Gentry MJ, Snitily MU, Preheim LC. Phagocytosis of Streptococcus pneumoniae measured in vitro and in vivo in a rat model of carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. J Infect Dis 1995; 171(2):350-5.
52. Kirsch R, Woodburne VE, Shephard eG, Kirsch RE. Patients with stable uncomplicated cirrhosis have normal neutrophil function. J Gastroenterol Hepatol 2000; 15(11):1298-306.
53. Muller-Eberhard HJ. The membrane attack complex of complement. Annual Rev Immunol 1986; 4:503-28.
54. Kinoshita T. Biology of complement: the overture. Immunol Today 1991; 12(9):291-295.
55. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. Cell Res 2010; 20(1):34-50.
56. Morgan BP, Gasque P. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why?. Clin Exp Immunol 1997; 107:1-7.

57. Finlayson ND, Krohn K, Fauconnet MH, Anderson KE. Significance of serum complement levels in chronic liver disease. *J Gastroenterology* 1972; 63:653-9.
58. Ellison RT, Horsburgh CR, Crud J. Complement levels in patients with hepatic dysfunction. *Dig Dis Sci* 1990; 35(2):231-5.
59. Nursinow SR, Zuraw BL, Curd JG. The hereditary and acquired deficiencies of complement. *Med Clin North Am* 1985; 69(3):487-504.
60. Homann C, Varming K, Hogasen K, Mollnes TE, Graudal N, Thomsen AC, et al. Acquired C3 deficiency in patients with alcoholic cirrhosis predisposes to infection. *Gut* 1997; 40: 544-549.
61. Such J, Guarner C, Enriquez J, Rodriguez JL, Seres I, Vilardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1988; 6:80-64.
62. Schirren CA, Jung MC, Zachoval R, Diepolder H, Hoffman R, Riethmüller G, Pape GR. Analysis of T cell activation pathways in patients with liver cirrhosis, impaired delayed hypersensitivity and other T cell-dependent functions. *Clin Exp Immunol* 1997; 108(1): 144-150.
63. Owens WE, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of athymic (nu/nu) mice. *Infect Immunol* 1980; 27:461-467.
64. Saitoh O, Sugi K, Kojima K, Matsumoto H, Nakagawa K, Kayazawa M, et al. Increased prevalence of intestinal inflammation in patients with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 1999; 5:391-96.
65. MacPherson A, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000; 288:2222-26.
66. Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev.* 2000; 174:21-34.
67. Henriksen JH, Moller S, Ring-Larsen H, et al. The sympathetic nervous system in liver disease. *J Hepatology* 1998; 29:328-41.
68. Henriksen JH, Ring-Larsen H, Kanstrup IL, et al. Splanchnic and renal elimination and release of catecholamines in cirrhosis. Evidence of enhanced sympathetic nervous activity in patients with decompensated cirrhosis. *Gut* 1984; 25:1034-43.
69. Henriksen JH, Ring-Larsen H, Christensen NJ. Hepatic intestinal uptake and release of catecholamines in alcoholic cirrhosis. Evidence of enhanced hepatic intestinal sympathetic nervous activity. *Gut* 1987; 28:1637-42.
70. Shaldon S, Peacock JH. The portal venous content of adrenaline and noradrenaline in portal hypertension. *Lancet* 1961; 1:957-61.
71. Henriksen JH, Moller S. Liver cirrhosis and arterial hypertension. *World J*

Gastroenterol 2006; 12(5):678-85.

72. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000; 54(4):595-638.

73. Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun* 2007; 21(6):736-45.

74. Mignini F, Streccioni V, Amenta F. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Auto Autacoid Pharmacol* 2003; 23(1):1-25.

75. Oberbeck R. Catecholamines: physiological immunomodulators during health and illness. *Curr Med Chem* 2006; 13(17):1979-89.

76. Dünser MW, Hasibeder WR. Sympathetic overstimulation during critical illness: adverse effects of adrenergic stress. *J Intensiv Care Med* 2009; 24(5):293-316.

77. Sanders VM, Straub RH. Norepinephrine, the  $\beta$ -adrenergic receptor, and immunity. *Brain, Beh, and Immunity* 2002; 16(4):290-332.

78. Sanders VM, Kasprovicz DJ, Kohm AP, Swanson MA. Neurotransmitter receptors on lymphocytes and other lymphoid cells. In: Alder R, Felten D, Cohen N (Eds). *Psychoneuroimmunology* 2001, AcademicPress, San Diego, pp. 161-96.

79. Kavelaars A. Regulated expression of  $\alpha$ -1 adrenergic receptors in the immune system. *Brain Behav Immun* 2002; 16(6):799-807.

80. Kin NW, Sanders VM. It takes nerves to tell T and B cells what to do. *J Leukoc Biol* 2006; 79(6):1093-104.

81. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang M, Sarma JV, Ward PA. Catecholamines – crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune / inflammatory cells or opening pandora's box. *J Mol Med* 2008; 14:195-204.

82. Sakata T, Watanabe A, Hobara N, Nagashima H. Chronic liver injury in rats by carbon tetrachloride inhalation. *Bull Environ Contam Toxicol* 1987; 38(6):959-61.

83. Wiest R, Cadelina G, Milstien S, McCuskey RS, Garcia-Tsao G, Groszmann RJ. Bacterial translocation up-regulates GTP-cyclohydrolase I in mesenteric vasculature of cirrhotic rats. *J Hepatol* 2003; 38(6):1508-15.

84. Nagano K, Umeda Y, Saito M, Nishizawa T, Ikawa N, Arito H, Yamamoto S, Fikushima S. Thirteen-week inhalation toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *J Occup Health* 2007; 49(4):249-59.

85. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanisms of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33(2):105-36.

86. Garner RC, McLean AE. Increased susceptibility to carbon tetrachloride poisoning in the rat after pretreatment with oral phenobarbital. *Biochem Pharmacol* 1969; 18(3):645-50.
87. Lal H, Puri SK, Fuller GC. Enhanced toxicity of carbon tetrachloride inhalation after phenobarbital pretreatment. *Pharmacol Res Com* 1970; 2(2):143-47.
88. Picklo MJ, Wiley RG, Lappi DA, Robertson D. Noradrenergic lesioning with an anti-dopamine beta-hydroxylase immunotoxin. *Brain Res* 1994; 666(2):195-200.
89. Picklo MJ, Wiley RG, Lonce S, Lappi DA, Robertson D. Anti-dopamine beta-hydroxylase immunotoxin-induced sympathectomy in adult rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275(2):1003-10.
90. Wiley RG, Kline IV RH. Neuronal lesioning with axonally transported toxins. *J Neurosci Methods* 2000; 103(1):73-82.
91. Skriwal D, Ghosh P, Batra JK. Ribosome inactivating protein saporin induces apoptosis through mitochondrial cascade, independent of translation inhibition. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(12):2880-88.
92. Bolognesi M, Merkel C, Sacerdoti D, Nava V, Gatta A. Role of spleen enlargement in cirrhosis with portal hypertension. *Dig Liver Dis.* 2002 Feb; 34(2):144-50.
93. Straub RH, Pongratz G, Weidler C, Linde HJ, Kirschning C, Glück T, Schölmerich J, Falk W. Ablation of the sympathetic nervous system decreases gram-negative and increases gram-positive bacterial dissemination: key roles for tumor necrosis factor / phagocytes and interleukin-4 / lymphocytes. *J Infect Diseases* 2005; 192:560-72.
94. Sasaki S, Nishikawa S, Miura T, Mizuki M, Yamada K, Madarame H, Tagawa YI, Iwakura Y, Nakane A. Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to *Staphylococcus aureus* infection through regulation of gamma interferon. *Infect Immun.* 2000 May; 68(5):2424-30.
95. Daynes RA, Araneo BA, Dowell TA, Huang K, Dudley D. Regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J Exp Med.* 1990; 171(4):979-96.
96. Ramírez F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D. Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J Immunol.* 1996; 156(7):2406-12.
97. Jabara HH, Ahern DJ, Vercelli D, Geha RS. Hydrocortisone and IL-4 induce IgE isotype switching in human B cells. *J Immunol.* 1991; 147(5):1557-60.
98. Campillo B, Richardet JP, Kheo T, Dupeyron C. Nosocomial spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in cirrhotic patients: impact of isolate type on prognosis and characteristics of infection. *Clin Infect Dis.* 2002 Jul 1; 35(1):1-10.
99. Worliceck M, Knebel K, Linde HJ, Moleda L, Schölmerich J, Straub RH, Wiest R. Splanchnic sympathectomy prevents translocation and spreading of *E coli* but not *S aureus* in liver cirrhosis. *Gut* 2010; 59:1127-34.

100. Opal SM, Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: Does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 1999; 27(8):1606-16.
101. Feezor RJ, Oberholzer C, Baker HV, Novic D, Rubinstein M, Moldawer LL, Pribble J, Souza S, Dinarello CA, Ertel W, Oberholzer A. Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infection and Immunity* 2003; 71(10):5803-13.
102. Hess DJ, Garni RM, Henry-Stanley MJ, Wells CL. *Escherichia coli* modulates extraintestinal spread of *Staphylococcus aureus*. *Shock* 2005; 24(4):376-81.



## ANHANG

Erklärung gemäß § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung

Abs. 3: Ich, Katja Segerer geb. Knebel, \*04.03.1984, habe nicht bereits an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland den Grad eines Doktors der Medizin erworben. Ich habe auch nicht endgültig die medizinische Doktorprüfung nicht bestanden.

Abs. 4: Ich bin nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des medizinischen Doktorgrads zugelassen bzw. als Doktorand zugelassen.

Veröffentlichung

Splanchnic sympathectomy prevents translocation and spreading of *E coli* but not *S aureus* in liver cirrhosis.

Worliceck M, **Knebel K**, Linde HJ, Moleda L, Schölmerich J, Straub RH, Wiest R.

## Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Reiner Wiest, der für mich in seinem wissenschaftlichen Arbeiten und im Umgang mit Mitmenschen Vorbild bleiben wird. Herzlich danken möchte ich auch Anja Szabo für Vorbereitungsarbeiten für meine Versuche sowie Dr. Tobias Bergler, der die Zusammenarbeit mit der Klinischen Chemie für mich übernommen hat. Danken möchte ich auch Lukas Moleda und Johannes Hartl mit denen eine gute Zusammenarbeit im Labor stets möglich war. Mein besonderer Dank für Unterstützung und Korrekturen geht außerdem an meine Eltern, Florian Segerer und Christina Nepl.